

**IN VIVO- UND IN VITRO-VERSUCHE
ZUR CHARAKTERISIERUNG DES PURINTRANSPORTS
BEI SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rainer Schmidt
aus Bad Kreuznach

1976

**IN VIVO- UND IN VITRO-VERSUCHE
ZUR CHARAKTERISIERUNG DES PURINTRANSPORTS
BEI SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rainer Schmidt
aus Bad Kreuznach

1976



1. Referent: Priv.-Doz. Dr. U. Reichert

2. Referent: Prof. Dr. W. Laskowski

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 12. 1976

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	<u>Einleitung</u>	5
2.	<u>In vivo Versuche zum molekularen Mechanismus von Substratbindung und Energiekopplung an das Purintransportsystem</u>	11
2.1	Material und Methoden	13
2.2	Ergebnisse und Diskussion	14
2.2.1	Ermittlung der kinetischen Parameter des Purintransportsystems in Abhängigkeit von pH-Wert und Ionenkonzentration des Aufnahme-mediums	14
2.2.2	Kompetitive Hemmung des Purintransportsystems durch organische Kationen	21
2.2.3	Ermittlung der für die Substratbindung verantwortlichen Gruppen mit Hilfe kinetischer Messungen und durch Einsatz gruppenspezifischer Hemmstoffe	29
2.2.4	Modelle für die Substratbindung und Energiekopplung an das Purintransportsystem	33
3.	<u>In vitro Versuche zur Charakterisierung des Transportsystems</u>	36
3.1	Erfolgt die Substratbindung an das Purintransportsystem über ein peripheres Membranprotein ?	38
3.1.1	Material und Methoden	39

	<u>Seite</u>
3.1.2	Ergebnisse und Diskussion 40
3.2	Versuche zur Isolierung integraler Mem- branproteine, die Purinbasen binden 43
3.2.1	Material und Methoden 44
3.2.2	Ergebnisse und Diskussion 47
3.3	Messung von Substratbindung und Substrat- aufnahme durch Plasmamembranvesikel 56
3.3.1	Material und Methoden 56
3.3.2	Ergebnisse und Diskussion 59
4.	<u>Zusammenfassung</u> 62
5.	<u>Literatur</u> 64

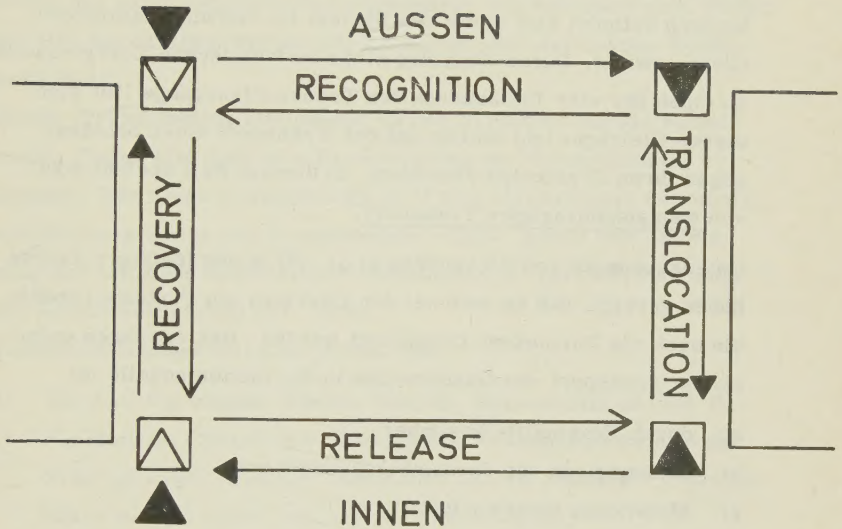
1. EINLEITUNG

Lebende Organismen sind trotz der Membranbarriere, die sie von ihrer Umwelt abgrenzt, keine geschlossenen, sondern offene Systeme. Sie sind zur Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktionen auf einen permanenten Stoff- und Energieaustausch mit ihrer Umwelt angewiesen. Dies setzt die Durchlässigkeit der Membran gegenüber bestimmten Stoffen voraus. Von der Natur der Membran her ist eine Permeabilität für hydrophobe, apolare Substanzen a priori gegeben. Mit steigender Polarität nimmt die Permeabilität schnell ab und ist für Ionen extrem gering. Nach Collander [1] ist die Permeationsgeschwindigkeit einer Substanz mit ihrem Verteilungskoeffizienten in einem Öl-Wasser-Gemisch korreliert. Ein charakteristisches Kennzeichen dieses als passive Permeation bezeichneten Transportvorgangs ist die lineare Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von der Differenz zwischen Außen- und Innenkonzentration des Permeanden. Für viele biologisch relevante Verbindungen (Nährstoffe, Stoffwechselprodukte u.a.) ist bekannt, daß sie selbst bei geringen Konzentrationen wesentlich schneller in das Zellinnere gelangen als es ihrem Verteilungskoeffizienten und ihrer Molekülgröße zukommt. Dieser Transportvorgang wird katalysiert. Man spricht daher von "erleichterter Diffusion" oder besser katalysierter Permeation. Der Vorgang erklärt sich aus der Anwesenheit bestimmter Strukturen ("Carrier") in der Membran, die spezifisch mit den Substratmolekülen assoziieren und diesen die Passage durch die Membran erleichtern. Da die Anzahl der für ein bestimmtes Substrat spezifischen Carrier in der Membran begrenzt ist, zeigt sich, daß die Aufnahmegeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration nur über einen kleinen Konzentrationsbereich linear ist und danach einen Sättigungswert erreicht. Dieses Verhalten läßt sich vielfach mit der von enzymkatalysierten Reaktionen her bekannten Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben.

Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen passiver und katalysierter Permeation ist die kompetitive Hemmbarkeit des Transports. Während bei der passiven Permeation nur selektiv nach Lipidlöslichkeit und Molekülgröße differenziert wird, erfolgt die katalysierte Permeation sehr spezifisch, d.h. Substanzen ähnlicher Struktur und Ladung konkurrieren um gemeinsame Bindungsstellen am Carrier und hemmen sich gegenseitig in ihrer Aufnahme.

Zur besseren Analyse des katalysierten Transports hat Pardee [2] 1968 den Transportvorgang in 4 Teilschritte zerlegt:

- 1] RECOGNITION,
Erkennen und Binden des Substrats durch das Transportsystem
- 2] TRANSLOCATION,
Verlagern des gebundenen Substrats von der Membranaußen- an die Membraninnenseite,
- 3] RELEASE,
Freisetzung des gebundenen Substratmoleküls in das Zellinnere,
- 4] RECOVERY,
Wiederherstellung des Ausgangszustandes.



Pardee-Modell des katalysierten Transports

Passive und katalysierte Permeation können nur den Ausgleich in den Konzentrations- bzw. elektrochemischen Gradienten eines Stoffes zwischen zwei Kompartimenten (z. B. Zelle und Umgebung) bewirken. Nach dem Ausgleich verlassen pro Zeiteinheit genauso viele Moleküle die Zelle wie in sie hineingelangen, vorausgesetzt, die betreffende Substanz wird nicht metabolisiert. Makroskopisch befindet sich somit das System im thermodynamischen Gleichgewicht. Durch Kopplung einer metabolischen Energiequelle an einen der vier Teilschritte des Transportvorgangs läßt sich dieses Gleichgewicht stören und der Transport einer Substanz gegen ihren Gradienten erreichen. In diesem Fall spricht man von energieabhängigem Transport.

Untersuchungen von Rickenberg et al. [3] in den fünfziger Jahren haben gezeigt, daß es sich bei den Carriern um Proteine handelt, die auch als Permeasen bezeichnet werden. Der von ihnen untersuchte Transport von Galaktosiden in die Bakterienzelle ist

- a] durch Enzymgifte hemmbar,
- b] abhängig von der Proteinbiosynthese und
- c] Mutationen unterworfen.

Inzwischen ist der direkte biochemische Nachweis der Proteinnatur der Galaktosidpermease [4] und anderer Transportsysteme gelungen.

Mit der Hefe Saccharomyces cerevisiae wurden Versuche durchgeführt, die zeigen, daß neben anderen für sie wichtigen Substanzen wie Kohlenhydrate und Aminosäuren auch Purinbasen über ein Transportsystem aufgenommen werden [5]. Purine, essentielle Bausteine der Nucleinsäuren und zellulärer Wirkstoffe, müssen, wenn sie nicht aus dem die Zelle umgebenden Medium aufgenommen werden können, als Nucleosidmonophosphate (Purin-Ribosephosphat) unter hohem Energieverbrauch selbst synthetisiert werden.

Reichert und Winter [5] konnten durch kompetitive Hemmversuche zeigen, daß die Purinbasen Adenin, Guanin, Hypoxanthin und die Pyrimidinbase Cytosin über ein gemeinsames Transportsystem aufgenommen werden. Es wurde weiter festgestellt, daß die Aufnahmefähigkeit abhängig von den Kulturbedingungen ist. So erreicht die initiale Aufnahmegeschwindigkeit ihr Maximum in der ersten Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase und reduziert sich wieder auf 10% des Maximalwertes mit Erreichen der stationären Wachstumsphase.

Durch Präinkubation stationärer Zellen in einem Glucose enthaltenden Puffer läßt sich eine Reaktivierung der Purinaufnahme erreichen. Für diese Reaktivierung ist Proteinbiosynthese notwendig, wie Hemmversuche mit Cycloheximid zeigen. Neben der Aktivierung der initialen Aufnahmegeschwindigkeit steigert Glucose auch die Aufnahmekapazität der Zelle.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß

- 1] die drei Purinbasen Adenin, Guanin, Hypoxanthin und die Pyrimidinbase Cytosin über das gleiche Transportsystem in die Zelle gelangen (Xanthin, Harnsäure und die anderen Pyrimidinbasen werden nicht oder nur schlecht erkannt),
- 2] dieses Transportsystem der Regulation durch den Energiestoffwechsel unterliegt und
- 3] die Kapazität der Purinaufnahme von der Gegenwart einer metabolischen Energiequelle abhängt.

Die Höhe der für Guanin und Hypoxanthin gefundenen Akkumulationsquotienten (Hypoxanthin 350fach, Guanin 1500fach) deuten darauf hin, daß diese Basen unter Energieverbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten innerhalb der Zelle akkumuliert werden. Bisher ist nicht bekannt, welche Energiequelle die Akkumulation ermöglicht

und bei welchem Schritt des Transportvorganges Energie verbraucht wird. Eine mögliche Beteiligung der Purin Phosphoribosyltransferasen (EC 2.4.2.7, 8) am Akkumulationsprozess, wie er bei Bakterien beschrieben wird [6-9], konnte nicht bestätigt werden [10].

In der folgenden Arbeit soll versucht werden, das Purintransport-system durch in vivo und in vitro Versuche weiter zu charakterisieren.

Im ersten Teil der Arbeit werden im wesentlichen mit Hilfe kinetischer Messungen und dem Einsatz kompetitiver und gruppenspezifischer Hemmstoffe an lebenden Zellen Modelle zur Erklärung des molekularen Mechanismus von Substratbindung und Energiekopplung erarbeitet.

Im zweiten Teil der Arbeit werden die in vivo Experimente durch Untersuchungen an Sphäroplasten und Plasmamembranvesikeln ergänzt. Durch Lockerung des Membrangefüges mit dem chaotropen Agens Natriumperchlorat und einem sich anschließenden osmotischen Schock soll abschließend versucht werden, das für die Substratbindung verantwortliche Protein zu isolieren.

2. IN VIVO VERSUCHE ZUM MOLEKULAREN MECHANISMUS VON SUBSTRATBINDUNG UND ENERGIEKOPPLUNG AN DAS PURIN- TRANSPORTSYSTEM

Der katalysierte Transport zeichnet sich durch eine Sättigung der initialen Aufnahmegeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration und durch seine kompetitive Hemmbarkeit mit strukturanalogen Substraten aus. Aus der Untersuchung dieser Abhängigkeiten können Informationen über den Mechanismus des Transportvorgangs gewonnen werden. Zwei quantitative Parameter dienen zur näheren Charakterisierung eines Transportsystems:

- 1] die maximale Aufnahmegeschwindigkeit $V_{\max}$ bei sehr hohen Substratkonzentrationen. Sie ist abhängig von der Gesamtzahl der das Substrat transportierenden Moleküle und damit von der für den jeweiligen Versuch eingesetzten Zellzahl,
- 2] die Substratkonzentration bei halbmaximaler Aufnahmegeschwindigkeit.

Dieser Wert wird als Transportkonstante K_t oder in Anlehnung an die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen als Michaelis-Konstante K_m bezeichnet. Er ist unabhängig von der eingesetzten Zellzahl und kann unter der Voraussetzung, daß die Translokation geschwindigkeitslimitierend für den Transportvorgang ist, als Maß für die Affinität des Transportsystems zu einem bestimmten Substrat betrachtet werden. Je höher die Affinität, desto niedriger ist der K_m -Wert.

Für die Aufnahme von Purinbasen durch Saccharomyces cerevisiae findet man für diese "Konstante" um fast zwei Zehnerpotenzen divergierende Angaben (siehe Tabelle 1).

Substrat	K _m - Werte (μM)		
	Pickering, W.R. Woods, R.A. [11]	Reichert, U. Winter, M. [5]	Polak, A. Grenson, M. [6]
Adenin	0,12	0,7 ± 0,15	8,5 ± 1,1
Hypoxanthin	0,22	1,9 ± 0,2	15,0 ± 0,4
Guanin	---	1,3 ± 0,2	-----

Tabelle 1

Eine mögliche Erklärung für diese extremen Abweichungen wäre darin zu suchen, daß die einzelnen Autoren ihre Aufnahmemessungen unter sehr abweichenden Bedingungen - insbesondere in Hinblick auf pH-Wert und Ionenstärke des Aufnahmemediums - durchgeführt haben. So verwandten z.B. Pickering und Woods [11] Vollmedium, dessen Zusammensetzung nicht näher definiert ist.

Aufnahmemessungen bei unterschiedlichen pH-Werten und verschiedenen Ionenkonzentrationen unter sonst gleichen Bedingungen könnten zeigen, daß diese Parameter den Purintransport beeinflussen.

2.1 Material und Methoden

Saccharomyces cerevisiae: Stamm R XII, eine freundliche Gabe von Dr. A. Kotyk, Prag, wurde bis zur frühen stationären Phase (ungefähr 10^8 Zellen/ml) in GYNP Medium (2% Glucose, 1% Yeast Nitrogen Base [Difco], 0,5 % Pepton [Merck]) bei 30°C unter Umrühren kultiviert.

Zellen aus 50 ml der frühstationären Kultur wurden gewaschen und in 250 ml Glucose-Citratpuffer (0,05 M Natriumcitrat, pH 5,4, 2% Glucose) bei 30°C unter Belüftung für 60 min inkubiert.

Nach dieser Vorbehandlung wurden die Zellen in 100 ml 2% Glucose-Lösung aufgenommen. 200 µl dieser Zellsuspension wurden mit 750 µl des unten genannten Puffers und 50 µl ^{14}C -Hypoxanthin (58 Ci/Mol) unterschiedlicher Konzentration gemischt und für 1 min bei 25°C inkubiert. Bei pH-Werten über 6,5 wurde die Inkubationszeit auf drei Minuten ausgedehnt, da in diesem Bereich die Aufnahmeaktivität sehr gering war. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml einer 1 mM Hypoxanthin-Lösung gestoppt. Die Suspension wurde unmittelbar danach über mit 1 mM Hypoxanthin-Lösung gewaschene Glasfaserfilter auf einem Millipore Vielfachfiltrationsgerät (Modell 3025) abgesaugt. Die Filter wurden mit der Stopplösung gewaschen und getrocknet. Ihre Radioaktivität wurde unter Verwendung eines Toluol-Cocktails (5g PPO [2,3-Diphenyloxazol]/1) im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Der Puffer wurde nach McIlvaine [12] zusammengestellt. 50 mM Citronensäure wurden mit 100 mM Na_2HPO_4 oder K_2HPO_4 in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Die Konzentrationen an Na^+ und K^+ wurden durch Zugabe der entsprechenden Hydroxide zu einem doppeltkonzentrierten Puffergemisch erhöht. Der pH-Wert wurde mit HCl bzw H_2SO_4 eingestellt.

2.2 Ergebnisse und Diskussion

2.2.1 Ermittlung der kinetischen Parameter des Purintransportsystems in Abhängigkeit von pH-Wert und Ionenkonzentration des Aufnahme-mediums

Um festzustellen, ob pH-Wert und Ionenkonzentration des Aufnahme-mediums einen Einfluß auf die kinetischen Konstanten des Transportsystems haben, wurde die initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für verschiedene Hypoxanthin-Konzentrationen in dem beschriebenen Puffergemisch nach McIlvaine bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Meßdaten wurden nach der Methode von Lineweaver und Burk [s. z. B. Dixon und Webb (13)] ^{ausgewertet} und die mit diesem Verfahren ermittelten K_m - und V_{max} -Werte gegenüber dem pH-Wert aufgetragen (Abb. 1).

Da es nicht möglich ist, den pH-Wert des Aufnahmemediums ohne gleichzeitige Veränderung der Ionenkonzentration zu variieren, muß das in Abb. 1 wiedergegebene Ergebnis zunächst als kombinierter Effekt von Protonen, Kationen und Anionen betrachtet werden. Um den Einfluß von Ionen auf das Transportsystem zu untersuchen, wurde die Ionenkonzentration bei einem konstanten pH-Wert variiert. Hierzu wurden in Parallelansätzen zu einer doppelt konzentrierten Pufferlösung, pH 6,1, verschiedene Mengen an KOH zugegeben. Anschließend wurde durch Zugabe von HCl bzw. H_2SO_4 der pH von 6,1 readjustiert.

Mit diesem Versuchsansatz kann überprüft werden,

- a) ob Ionen überhaupt einen Effekt haben und
- b) wenn ja - ob dieser Effekt auf die Wirkung der An- oder Kationen zurückzuführen ist.

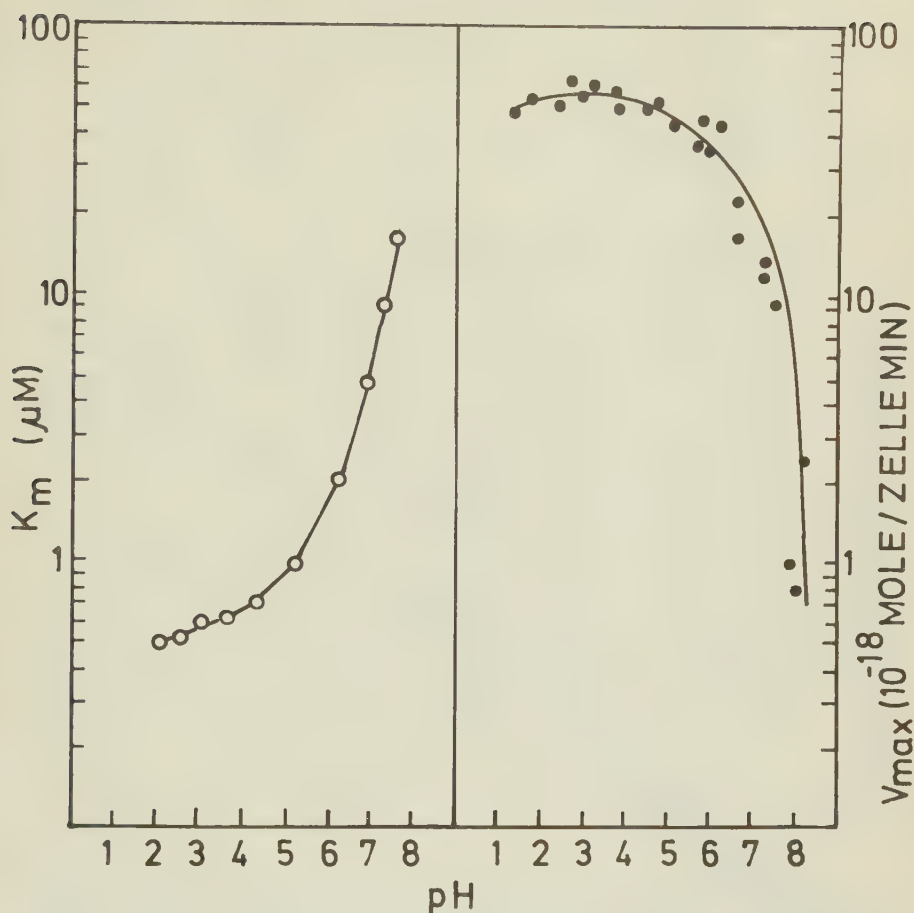


Abb. 1:

Der scheinbare K_m -Wert K'_m und die maximale Geschwindigkeit $V_{\max}$ der Hypoxanthin-Aufnahme in Abhängigkeit vom pH-Wert des Aufnahme-puffers. Die K'_m -Werte sind für ein Puffergemisch aus Citronensäure und Na_2HPO_4 aufgetragen, wobei die Na^+ Konzentration von 0 mM (pH 2,2) in Schritten von 15 mM auf 135 mM (pH 7,35) ansteigt. Die $V_{\max}$ -Werte wurden aus verschiedenen Experimenten zusammengetragen.

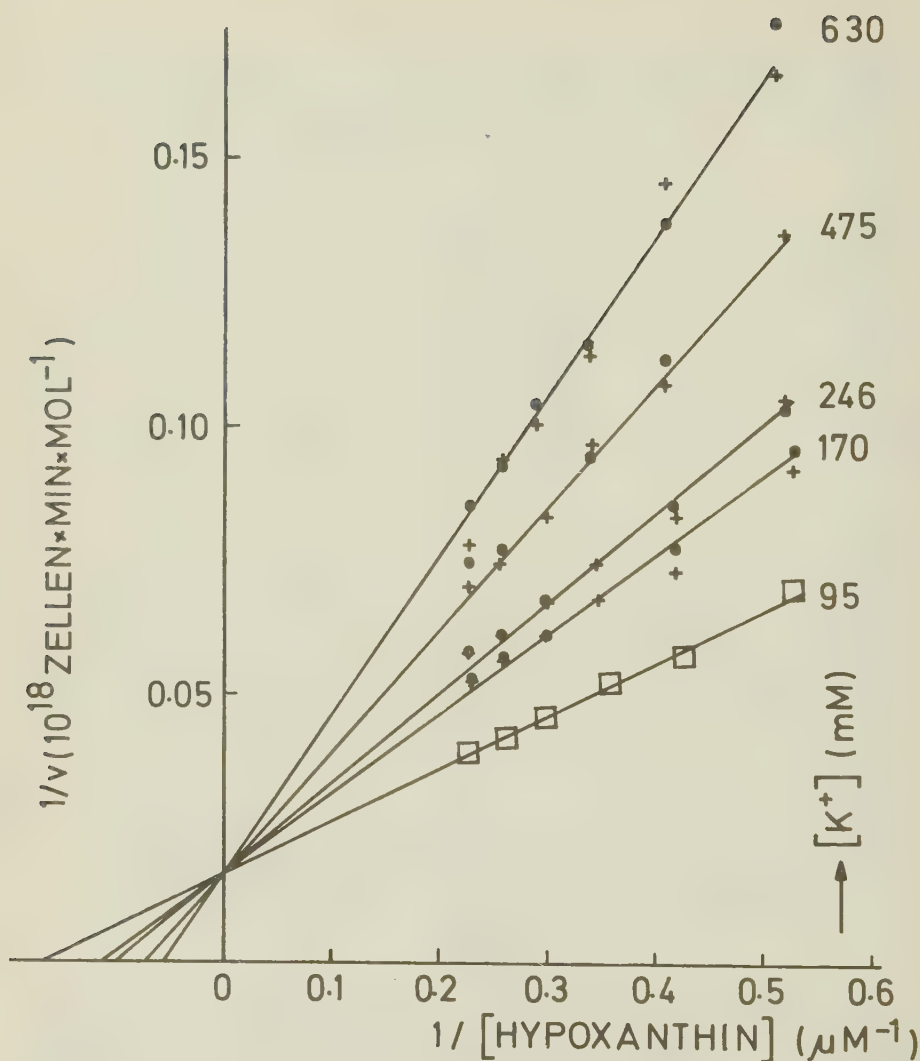


Abb. 2:

Lineweaver-Burk-Diagramm der Hypoxanthin-Aufnahme in Gegenwart steigender K^+ -Konzentrationen bei pH 6,1. Werte für ein Puffergemisch aus Citronensäure und K_2HPO_4 mit unterschiedlichen KCl- (+—+) bzw. K_2SO_4 (●—●)-Konzentrationen.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abb. 2 in Form eines Lineweaver-Burk-Diagramms dargestellt. Es zeigt:

- 1] daß steigende Salzkonzentrationen im Puffer den Purintransport beeinträchtigen und
- 2] daß diese Beeinträchtigung unabhängig von der Art der eingesetzten Anionen (Cl^- , SO_4^{--}) ist.

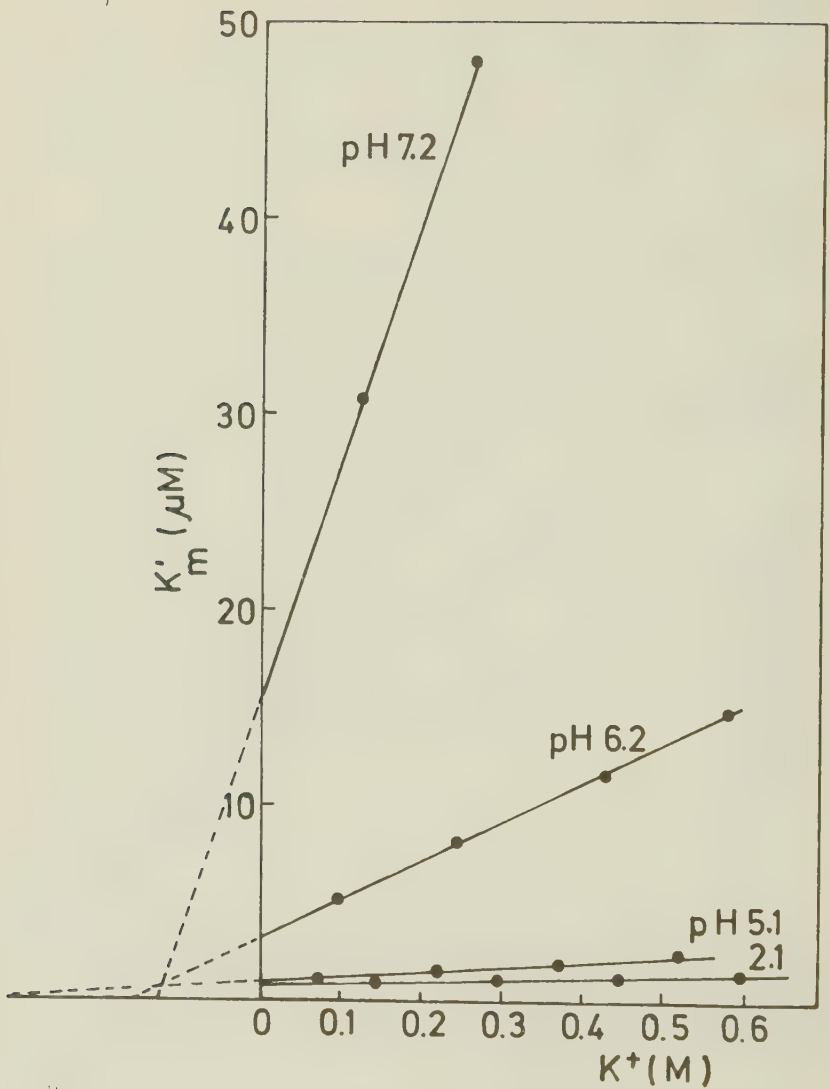
Die beobachtete Hemmwirkung muß also ein Kationeneffekt sein.

Da steigende Kaliumkonzentrationen den K_m -Wert erhöhen, ohne die maximale Aufnahmegeschwindigkeit $V_{\max}$ zu verändern, wirken sie als kompetitive Inhibitoren, d.h. sie konkurrieren mit dem Substrat um die Bindung an das Transportsystem.

Es bleibt zu klären, welchen Einfluß die Wasserstoffionenkonzentration auf den K_m -Wert des Transportsystems hat. Da Aufnahmemessungen bei definiertem pH-Wert sinnvollerweise nur in einem gepufferten Milieu möglich sind, d.h. in Gegenwart von Ionen, die ihrerseits die Affinität des Transportsystems beeinflussen können, erhält man nur scheinbare K_m -Werte (K'_m -Werte). Hemmen - wie in unserem Fall - Kationen kompetitiv, so ist der K'_m -Wert von der Kationenkonzentration abhängig. Diese Abhängigkeit wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$K'_m = K_{mo} + (K_{mo} / K_i) \cdot i \text{ [vergl. z.B. Dixon u. Webb (13)]}$$

Hierbei sind K_{mo} der K_m -Wert des Substrates in Abwesenheit des Inhibitors, i die Inhibitorkonzentration und K_i die Inhibitorkonstante. (Der K_i -Wert eines Inhibitors ist vergleichbar mit dem K_m -Wert eines Substrates, er kann als ein Maß für die Spezifität des Inhibitors angesehen werden).



K'_m -Wert für Hypoxanthin in Abhängigkeit von der K^+ -Konzentration bei unterschiedlichen pH-Werten

Trägt man somit die bei konstantem pH-Wert und steigender Kalium-Konzentration ermittelten K'_m -Werte über der entsprechenden K^+ -Konzentration auf, erhält man eine Gerade, deren Ordinatenschnittpunkt den K_{mo} -Wert und deren Schnittpunkt mit der negativen Abszisse den K_i -Wert liefert (vgl. hierzu Abb. 3).

Zur Überprüfung eines möglichen Protoneneffektes auf das Transportsystem wurden die in Abb. 2 beschriebenen Experimente bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Die erhaltenen K'_m -Werte wurden in einem Sekundärdiagramm über den jeweiligen Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Abb. 3 faßt das Ergebnis einer derartigen Versuchsreihe zusammen. Aus ihr ist zu entnehmen, daß mit sinkendem pH-Wert, d.h. steigender Protonenkonzentration, der K_{mo} -Wert abnimmt. Protonen erhöhen offenbar die Affinität des Transportsystems zu seinem Substrat, während Kaliumionen diese herabsetzen.

In weiteren Experimenten wurde auf die beschriebene Weise eine Reihe K_{mo} -Werte für den pH-Bereich von 2 - 9 ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt. Es zeigt, daß der K_{mo} -Wert gerade im physiologisch interessanten Bereich sehr stark pH-abhängig ist. Die starke Verringerung des K_{mo} -Wertes im sauren Bereich deutet darauf hin, daß die Bindung des Substrates Protonen erfordert.

Die bisherigen Versuche gestatten jedoch nicht die Unterscheidung, ob

- a] das Substrat,
- b] das Transportsystem,
- c] sowohl das Substrat als auch das Transportsystem protoniert werden muß, um eine Bildung des Substrat-Transportprotein-Komplexes zu ermöglichen.

In den folgenden Experimenten wird versucht, diese Frage zu beantworten.

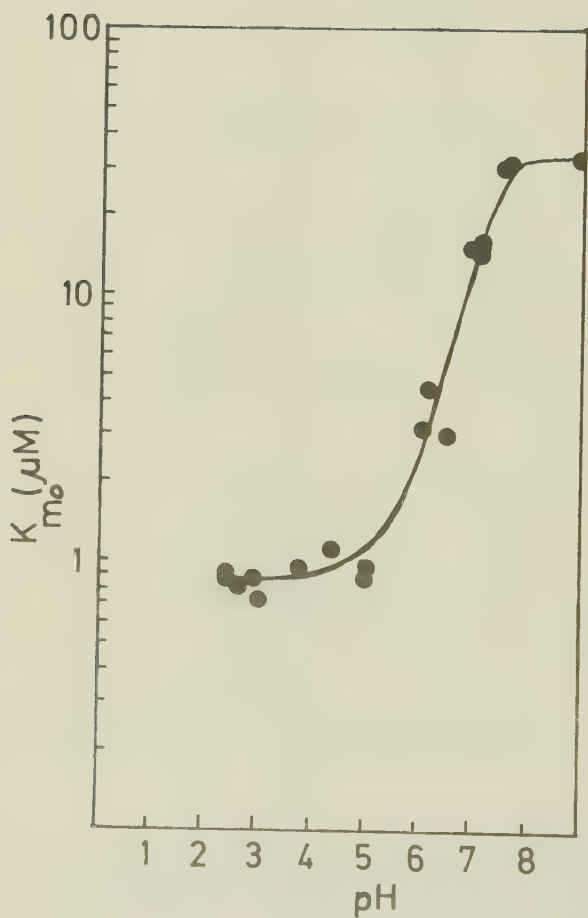


Abb. 4:

K_{m0} -Werte für die Hypoxanthin-Aufnahme bei unterschiedlichen pH-Werten.

2.2.2 Kompetitive Hemmung des Purintransportsystems durch organische Kationen

Purine und Pyrimidine werden - zumindest teilweise - im sauren pH-Bereich zu Kationen protoniert. Das Gleichgewicht zwischen geladener und ungeladener Form ist für die jeweilige Base spezifisch und wird durch den in Tabelle 2 aufgeführten pK_{Kation} -Wert beschrieben. Je niedriger der pK-Wert, um so geringer ist der Anteil der kationischen Form bei gegebenem pH.

Ist für die Bildung des Komplexes aus Substrat und Transportprotein eine Protonierung des Substratmoleküls erforderlich, so sollte für die einzelnen Basen eine Korrelation zwischen K_m - und p_K -Wert bestehen. Diese Korrelation sollte auch für die K_1 -Werte der einzelnen Basen gelten, wenn sie nicht als Substrat, sondern als kompetitive Inhibitoren eingesetzt werden.

Bei der Betrachtung der in Tabelle 2 aufgeführten Daten fällt auf, daß das Purintransportsystem eine relativ hohe Affinität für so unterschiedliche Basen wie Cytosin und Guanin hat, wohingegen für so verwandte Moleküle wie Cytosin und Uracil oder Guanin und Xanthin (Abb. 5) extreme Unterschiede in der Affinität bestehen.

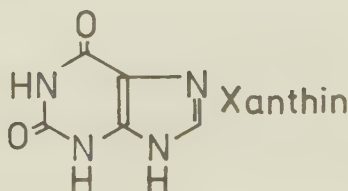
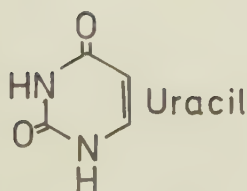
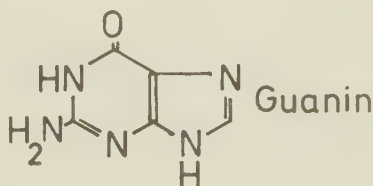
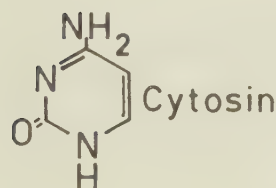


Abb. 5:

Strukturformeln von Cytosin, Guanin, Uracil und Xanthin

Inhibitor	pK _{Kation}	Substrat			
		K _m - und K _i -Werte (μMol/l)			
		Adenin	Hypoxanthin	Guanin	Cytosin
Adenin	4,1	0,7	0,9	0,65	-
Hypoxanthin	1,98	1,9	1,9	1,7	-
Guanin	3,3	1,35	1,4	1,3	-
Cytosin	4,45	1,1	1,2	1,0	1,3
Purin	2,4	-	130	-	-
Xanthin	0,8	-	190	-	210
Uracil	0,5	-	1000	-	1000
Thymin	0	-	1000	-	1000

Tabelle 2

pK-, K_m- und K_i-Werte für einige Substrate und kompetitive Inhibitoren des Purintransportsystems [l. c. (5) und eigene Untersuchungen]. K_m- und K_i-Werte wurden bei 25°C in 50 mM Natriumcitratpuffer, pH 5,4, ermittelt.

Vergleicht man weiterhin die aufgeführten pK-Werte der Basen mit ihren K_m- und K_i-Werten, so zeigt sich die Tendenz, daß mit sinkenden pK-Werten auch die Affinität zum Purintransportsystem abnimmt, d.h. je geringer der Anteil der protonierten Form einer Base bei einem gegebenen pH-Wert ist, um so schlechter wird sie als Substrat erkannt.

Aus dieser und der bereits bekannten Tatsache, daß anorganische Kationen das Purintransportsystem kompetitiv hemmen, läßt sich die Hypothese ableiten, daß nur die protonierte, kationische Form der Base als Substrat erkannt wird.

Wenn dies richtig ist, dann sollten auch andere organische Verbindungen die Purinaufnahme kompetitiv hemmen, wenn sie unter den gegebenen Aufnahmebedingungen (pH 5,4) teilweise oder ganz als Kationen vorliegen. Strukturähnliche nicht protonierbare Substanzen dürften dagegen keinen Hemmeffekt zeigen.

In einem ersten Ansatz wurde versucht, die Hypoxanthin-Aufnahme durch die Zugabe von Harnstoff, Guanidin und Octylguanidin⁺⁺ (Abb. 6) zu hemmen. Von diesen drei strukturähnlichen Verbindungen liegen praktisch nur Guanidin und Octylguanidin als Kationen vor.

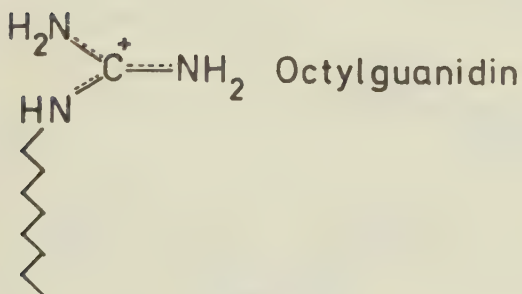
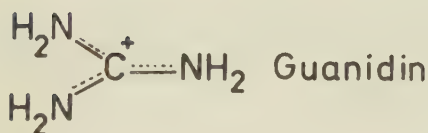
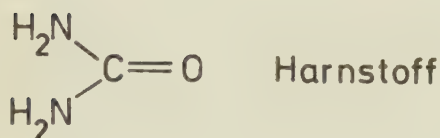


Abb. 6:

Strukturformeln von Harnstoff, Guanidin und Octylguanidin

⁺⁺ Octylguanidin wurde freundlicherweise von Dr. A. Peña, University of Mexico, zur Verfügung gestellt

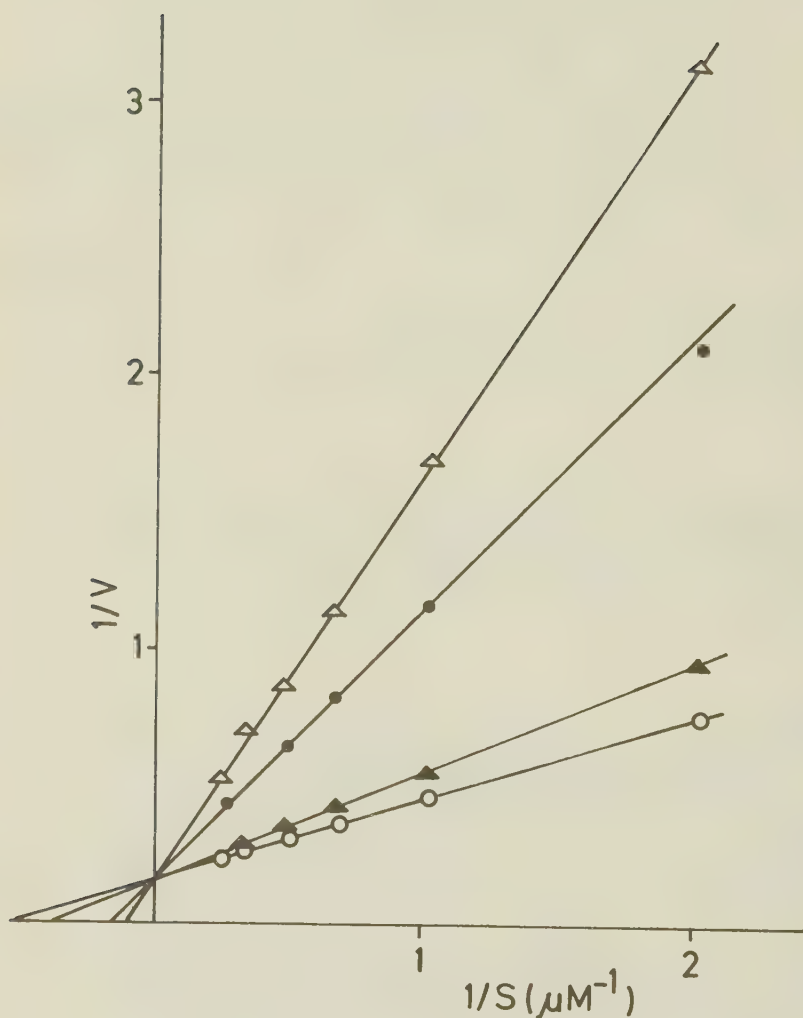


Abb. 7:

Lineweaver-Burk-Diagramm der Hypoxanthin-Aufnahme in Abwesenheit eines organischen Inhibitors (○—○) und in Gegenwart von 300 mM Harnstoff (▲—▲), 75 mM Guanidin (△—△) bzw. 0,75 mM Octylguanidin (●—●).

Wie aus dem Versuchsergebnis zu ersehen ist (Abb. 7), wird die Hypoxanthinaufnahme effektiv nur von den als Kationen vorliegenden Verbindungen Guanidin und Octylguanidin kompetitiv gehemmt.

Es wurden folgende K_i -Werte ermittelt:

Harnstoff	$K_i = 1600 \text{ mM}$
Guanidin	$K_i = 20 \text{ mM}$
Octylguanidin	$K_i = 0,3 \text{ mM}$

Der weitaus geringere K_i -Wert für Octylguanidin ist auf die hydrophobe Seitenkette des Moleküls zurückzuführen, die möglicherweise eine Anreicherung der Substanz an der Membran bewirkt.

So erklärt sich möglicherweise auch der extrem niedrige K_i -Wert ($K_i = 10 \mu\text{M}$) des Cetrimonium-Kations, das in einem weiteren Versuch neben anderen Detergenzien (Abb. 8) als Inhibitor der Hypoxanthinaufnahme eingesetzt wurde.

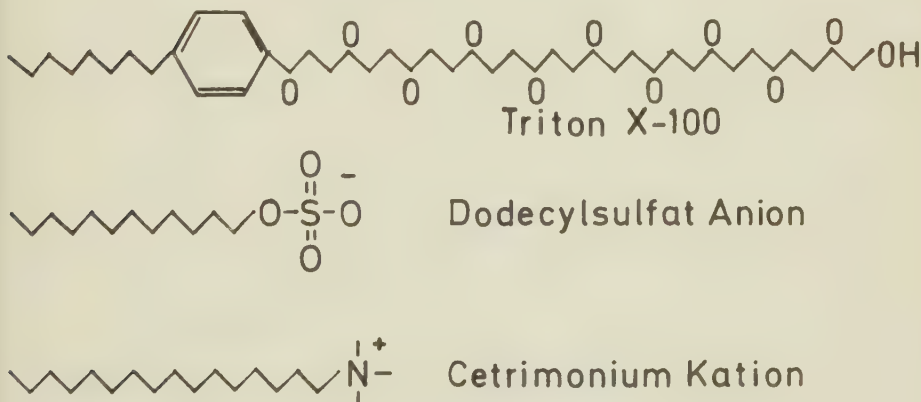


Abb. 8:

Strukturformeln von Triton X-100, Dodecylsulfat-Anion und Cetrimonium-Kation

Wie aus Abb. 9 zu erkennen ist, wird die Aufnahme weder durch das neutrale Triton X-100 noch durch das Anion Dodecylsulfat gehemmt. Daß die Wirkung des Cetrimonium-Kations nicht auf einer unspezifischen Zerstörung des Membrangefüges beruht, sondern ein kompetitiver Hemmeffekt ist, zeigt Abb. 10. Steigende Cetrimonium-Konzentrationen erhöhen den K_m -Wert, ohne die maximale Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} zu beeinflussen.

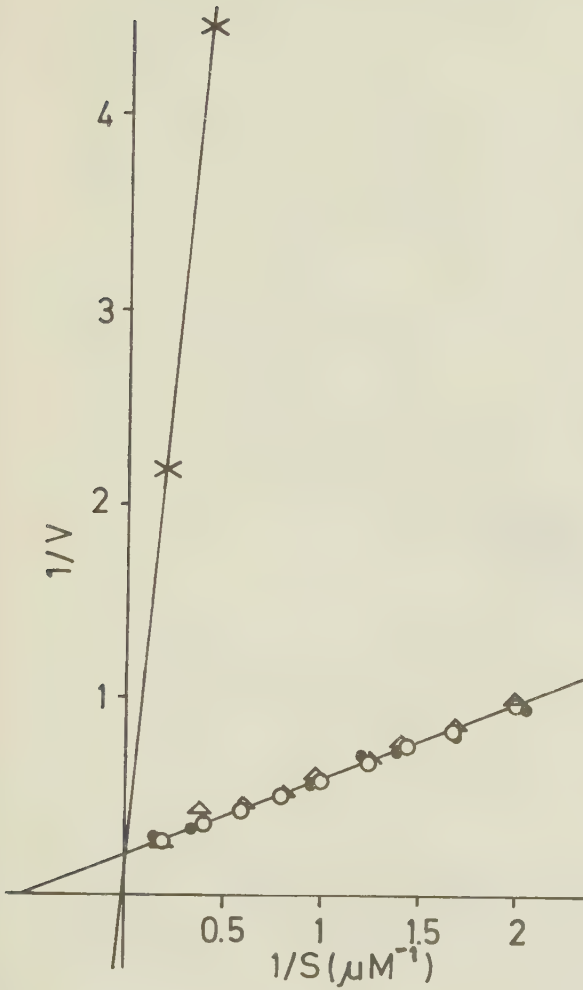


Abb. 9:

Lineweaver-Burk-Diagramm der Hypoxanthinaufnahme in Abwesenheit eines organischen Inhibitors ($\circ-\circ$) und in Gegenwart von 37,5 μM Triton X-100 ($\bullet-\bullet$), 37,5 μM Natriumdodecylsulfat ($\triangle-\triangle$) bzw. 37,5 μM Cetrimoniumbromid ($\times$).

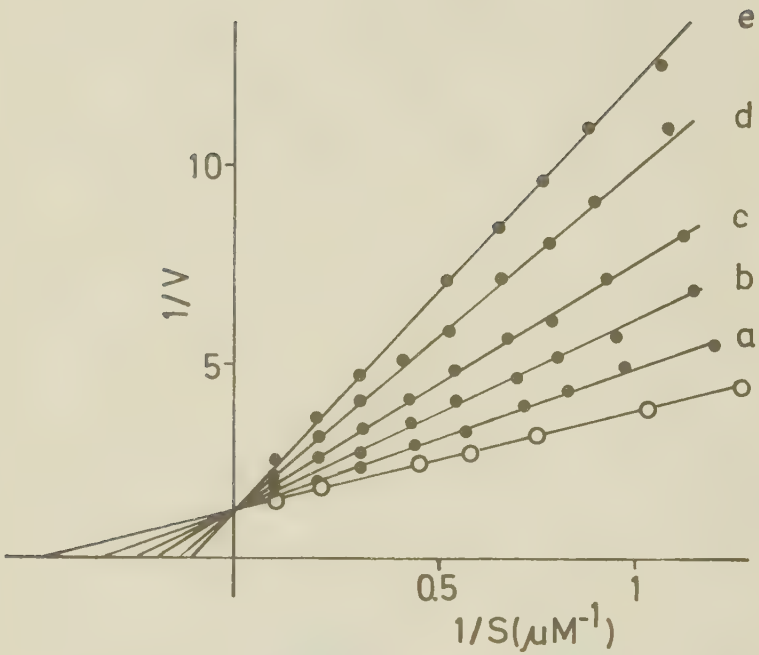


Abb. 10:

Lineweaver-Burk-Diagramm der Hypoxanthinaufnahme in Abwesenheit ($\bigcirc-\bigcirc$) und in Gegenwart von 7,5 μM (a), 15 μM (b), 22,5 μM (c), 30 μM (d) bzw. 37,5 μM (e) Cetrimoniumbromid.

2.2.3 Ermittlung der für die Substratbindung verantwortlichen Gruppen mit Hilfe kinetischer Messungen und durch Einsatz gruppenspezifischer Hemmstoffe

Bindet das Purintransportsystem nur die protonierte, kationische Form der Base, so ist möglicherweise eine unter den gegebenen Aufnahmebedingungen als Anion vorliegende Aminosäureseitenkette des Transportproteins an der Substratbindung beteiligt. Um solche Fragen der Substratbindung zu klären, werden in der Enzymkinetik die bei unterschiedlichen pH-Werten ermittelten kinetischen Parameter nach Dixon [vgl. hierzu l. c. (13)] in einem Diagramm

$$\log (V_{\max}/K_m) \text{ gegen pH}$$

aufgetragen. Zeichnet man die Steigungsgeraden der Kurve ein, so erhält man auf der pH-Skala unter deren Schnittpunkten die pK-Werte der an der Substratbindung beteiligten funktionellen Gruppen (vgl. Abb. 11).

Versuchsweise wurde dieses Verfahren zur Ermittlung der an der Substratbindung beteiligten Gruppen des Purintransportsystems angewandt. Hierzu wurden die bereits bei unterschiedlichen pH-Werten gemessenen $V_{\max}$ - und K_m -Werte (Abb. 1 bzw. 4) im Dixon-Diagramm aufgetragen (Abb. 11).

Aus den Schnittpunkten der Steigungsgeraden ergeben sich zwei pK-Werte: ein pK-Wert von 1,8 (pK_{as}), der dem pK_{Kation} von Hypoxanthin entspricht (Tabelle 1), und ein pK-Wert von 5,2 (pK_{ae}), der einer an der Substratbindung beteiligten Gruppe des Transportproteins zuzuordnen ist.

Die pK-Werte der einzelnen, in Proteinen vorkommenden funktionellen Gruppen, findet man in einschlägigen Werken tabellarisch zusammengefaßt.

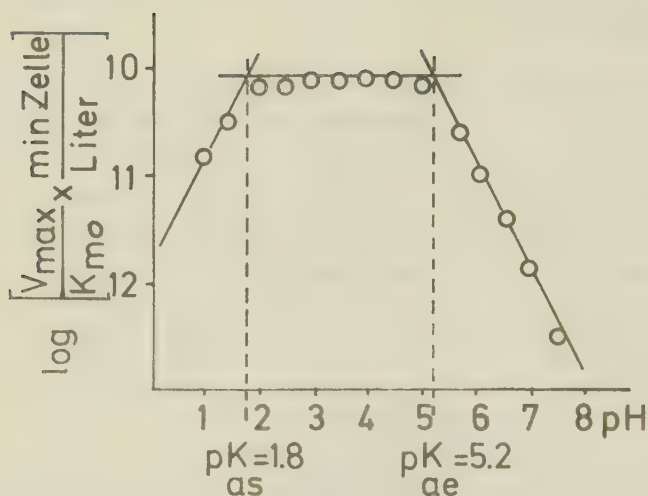


Abb. 11:

Dixon-Diagramm $\log (V_{\max}/K_{mo})$ über den pH-Werten zur Ermittlung der pK-Werte der für die Bindung von Hypoxanthin an das Transportsystem verantwortlichen Gruppen.

In diesen Tabellen werden allerdings nur Bereiche angegeben, da die Gesamtstruktur eines Proteins sowie benachbarte Aminosäuren den pK-Wert einer bestimmten Aminosäureseitenkette im Protein beeinflussen. Dem für das Purintransportsystem ermittelten pK-Wert von 5,2 entspricht am ehesten eine endständige Aspartyl- oder Glutamyl-Carboxylgruppe.

Mit Hilfe gruppenspezifischer Hemmstoffe gelingt es, funktionelle Gruppen selektiv zu blockieren. Ist eine solche Gruppe an der Substratbindung beteiligt, so kann dies zu einer Verminderung oder zum Verlust der Transportaktivität führen.

Um zu überprüfen, ob in unserem Falle eine Carboxylgruppe an der Substratbindung beteiligt ist, wurden die Zellen vor der Aufnahmemessung für 15 min in einer 100 mM Lösung des für Carboxylgruppen spezifischen Hemmstoffs EDAC [N-Äthyl-N-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid] [14] präinkubiert. Als Kontrolle diente ein Parallelansatz mit 100 mM TNBS [2,4,6 Trinitrobenzosulfonsäure], einem für Aminogruppen spezifischen Reagenz [15].

Wie Abb. 12 zu entnehmen ist, wird die Hypoxanthinaufnahme durch eine Vorbehandlung der Zellen mit TNBS kaum beeinträchtigt, dagegen hemmen 100 mM EDAC die Aufnahme fast vollständig.

Um nachzuweisen, daß die Hemmung der Hypoxanthinaufnahme durch EDAC auf die Blockierung einer funktionellen Gruppe im Bindungszentrum zurückzuführen ist, wurde während der Präinkubation der Zellen in EDAC dem Inkubationsmedium 1 mM Cytosin zugegeben. Wird das Substrat Cytosin vom Transportsystem über diese Gruppe gebunden, so ist sie während des Transportprozesses vor der Reaktion mit EDAC geschützt. Bei der sich anschließenden Messung der Hypoxanthinaufnahme sollten Zellen, die mit EDAC + Cytosin präinkubiert wurden, weniger in ihrer initialen Aufnahmegeschwindigkeit beeinträchtigt sein als Zellen, die nur in EDAC inkubiert wurden. Die Versuchsergebnisse in Abb. 13 bestätigen den Schutzeffekt von Cytosin.

Diese Versuche zeigen, daß möglicherweise eine negativ geladene Carboxylgruppe die protonierte Form des Substrates bindet.

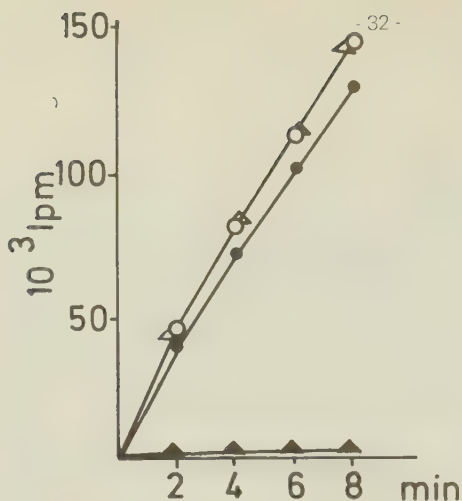


Abb. 12: Hypoxanthinaufnahme nach 15 min Präinkubation in
 a) 0,1 M Carbonatpuffer, pH 9,6 (○—○)
 b) 0,02 M Diäthylbarbiturat, pH 7,2 (△—△)
 c) 0,1 M Carbonat, pH 9,6 + 0,1 M TNBS (●—●)
 d) 0,02 M Diäthylbarbiturat, pH 7,2 + 0,1 M EDAC (▲—▲).

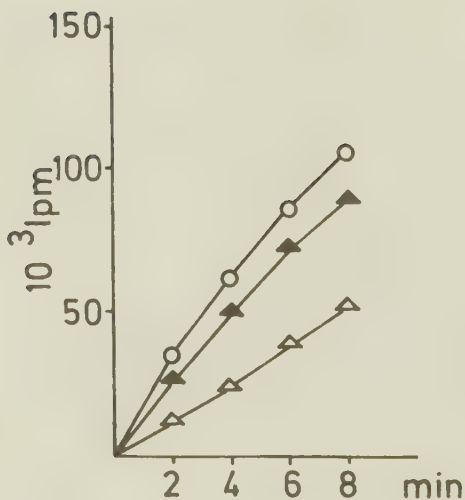


Abb. 13:

Hypoxanthinaufnahme nach 15 min Präinkubation in 0,02 M Diäthylbarbiturat, pH 7,2 + 1 mM Cytosin (○—○), 1 mM Cytosin + 50 mM EDAC (▲—▲) bzw. 50 mM EDAC ohne Cytosin (△—△).

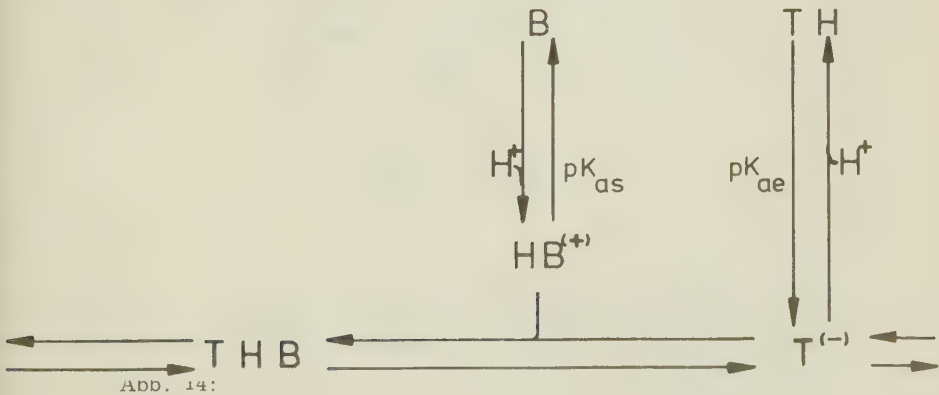
2.2.4 Modelle für die Substratbindung und Energiekopplung an das Purintransportsystem

Anhand der vorausgegangenen in vivo Versuche lassen sich Modelle für die Mechanismen der Substratbindung und Energiekopplung an das Purintransportsystem von Saccharomyces cerevisiae erstellen.

Die Versuche zeigen,

- a] daß monovalente Kationen und andere kationische Verbindungen die Purinaufnahme kompetitiv hemmen,
- b] daß Protonen die Affinität des Transportsystems für seine Substrate erhöhen,
- c] daß sich - zumindest in der Tendenz - mit steigendem pK-Wert der Basen deren Affinität zu dem Transportsystem erhöht und
- d] daß an der Substratbindung wahrscheinlich eine Carboxylgruppe des Transportproteins beteiligt ist.

In Abb. 14 wird unter Berücksichtigung der genannten Fakten folgendes Modell für den molekularen Mechanismus der Substratbindung vorgeschlagen.



Modell der Substratbindung an das Purintransportsystem

Darüberhinaus läßt sich aus den genannten Fakten und der Tatsache, daß in stoffwechselaktiven Hefezellen Protonen und Kaliumionen ungleich zwischen cytoplasmatischem Raum und dem die Zelle umgebenden Medium verteilt sind $[16]^{++}$, ein Modell über den molekularen Mechanismus der Energiekopplung an das Purintransportsystem postulieren. Es sieht vor, daß die Akkumulation der Purinbasen durch Kopplung des vorhandenen $K^+ - H^+$ -Gradienten an das Purintransportsystem erreicht wird (Abb. 16).

Außerhalb der Zelle konkurrieren bei niedrigem pH hochaffine, kationische Substratmoleküle mit Kaliumionen geringerer Affinität und Konzentration um das aktive Bindungszentrum. Die protonierte Base wird gebunden und translociert. Bedingt durch den höheren intrazellulären pH-Wert zerfällt der unter Beteiligung eines Protons gebildete Komplex zwischen Substrat und Transportsystem. Die Base und ein Proton werden frei. An die freigewordene Bindungsstelle tritt aufgrund der hohen Konzentration und bei diesem pH erhöhten Affinität ein Kaliumion.

Der während des Transports beanspruchte $K^+ - H^+$ -Gradient wird unter Inanspruchnahme metabolischer Energie durch die $K^+ - H^+$ -Pumpe regeneriert.

In der Terminologie von Mitchell [17] würde das Purintransportsystem bei Saccharomyces cerevisiae als Protonen-Symporter und Kalium-Antiporter arbeiten.

++

Dieser Konzentrationsgradient wird unter Energieverbrauch durch eine $K^+ - H^+$ -Austauschpumpe aufgebaut.

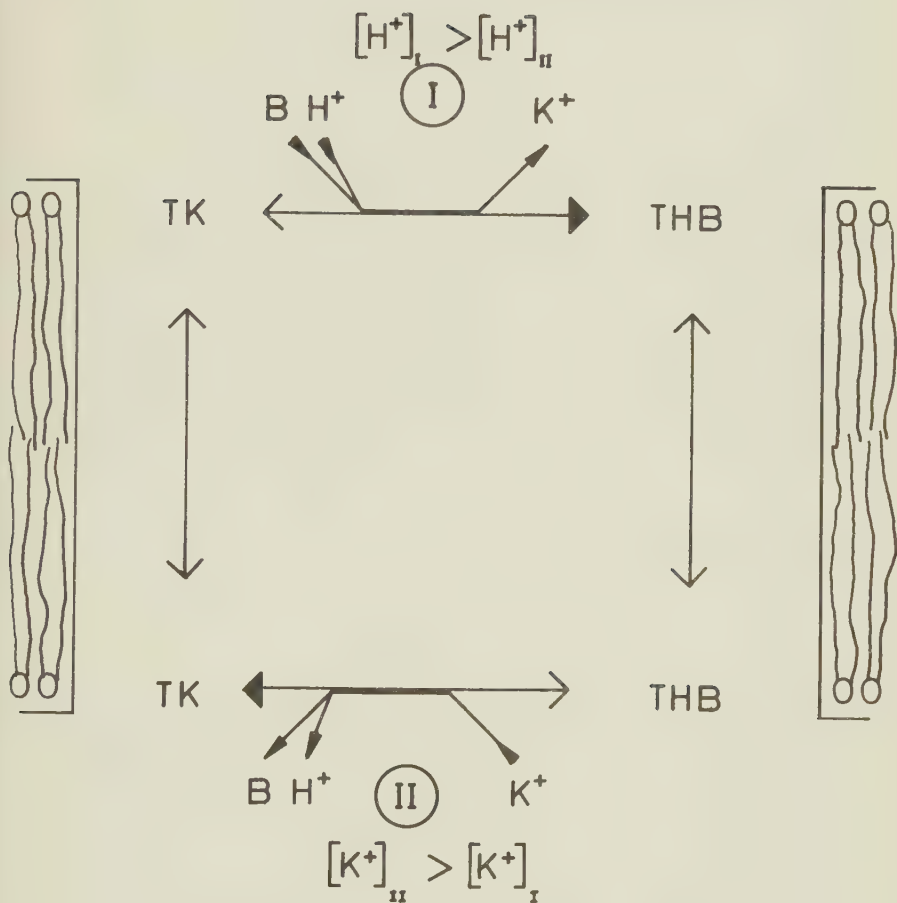


Abb. 16:

Mögliches Modell zur Klärung der Akkumulation von Purinbasen (B) durch ein als H^+ -Symporter und K^+ -Antiporter fungierendes Transportsystem (T).

3 IN VITRO VERSUCHE ZUR CHARAKTERISIERUNG DES PURIN-TRANSPORTSYSTEMS

Handelt es sich bei Transportsystemen um Proteine oder Protein-komplexe, so sind diese funktionsbedingt im Membranbereich lokalisiert.

In vielen Fällen ist es bereits gelungen, den für die Substratbindung verantwortlichen Teil von Transportsystemen zu isolieren [18, 19]. Sind solche Substratbindungsproteine peripher nur sehr lose mit der Plasmamembran assoziiert, kann schon das Waschen der Zellen ausreichen, um sie von der Membran zu lösen. Opekárová et al. [20] gelang es durch Waschen exponentieller Saccharomyces-Zellen, ein Arginin-Bindungsprotein zu isolieren. Sind Bindungsproteine fester an die Membran gebunden oder in sie integriert, bedarf es anderer Methoden, um sie zu isolieren. Eine häufig angewandte Methode ist der Einsatz von Detergenzien, die je nach Art und Konzentration das Membrangefüge lockern oder es ganz zerstören [21, 22].

Mit Hilfe des Detergenz Tween 80 isolierten Horák und Kotyk [23] das Glucose-Bindungsprotein aus Hefezellen.

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung integraler Membranproteine ist der Einsatz chaotroper Ionen. Bei diesen von Hatefi und Hanstein [24, 25] beschriebenen Ionen handelt es sich um Anionen mit geringer Ladungsdichte, d.h. mit großem Ionenradius und einer singulären Ladung.

Chaotrope Anionen haben die Eigenschaft, die Struktur des Wassers zu "zerstören". Sie verringern seine Polarität und erhöhen dadurch die Löslichkeit für apolare Substanzen [26].

Wird die Polarität einer wässrigen Zellsuspension durch Zugabe chaotroper Agenzien verringert, so hat dies auch eine Destabilisierung der Plasmamembranstruktur zur Folge, deren Struktur und

Stabilität im wesentlichen eine Funktion des sie umgebenden wässrigen polaren Milieus ist (hydrophobe Wechselwirkungen). Da sich gleichzeitig die Löslichkeit apolarer Substanzen erhöht, können sich Proteine aus dem Membrangefüge lösen.

Die bisher vorgenommene Unterteilung eines Transportsystems in ein für die Bindung und ein für die Translokation verantwortliches Protein ist nicht zwingend. Substratbindung und Translokation können auch von nur einem integralen Membranprotein wahrgenommen werden. Ein Beispiel hierfür ist das von Jones und Kennedy [27] aus Escherichia coli isolierte β -Galaktosid-Transportsystem. Es besteht aus nur einem integralen Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 31 000. Das aus etwa 300 Aminosäuren bestehende Protein erreicht eine Molekülgröße, die der Dicke einer Plasmamembran entspricht.

3.1 Erfolgt die Substratbindung an das Purintransportsystem über ein peripheres Membranprotein ?

Die Substratbindung an das Purintransportsystem kann entweder über ein peripheres, lose mit der Plasmamembran assoziiertes Protein erfolgen oder über ein fest in das Membrangefüge integriertes Bindungsprotein bzw. Transportprotein.

Zunächst soll untersucht werden, ob die Substratbindung über ein peripheres Membranprotein erfolgt.

Opekarová et al. [20] gelang es, das Argininbindungsprotein aus exponentiell wachsenden Hefezellen nur durch deren Überführung in destilliertes Wasser aus dem periplasmatischen Raum zu lösen.

In den sich anschließenden Experimenten soll untersucht werden, ob sich durch das von Opekarová et al. angewandte Verfahren auch Purin-Bindungsproteine von der Membran lösen. Zusätzlich werden aus exponentiellen Zellen Sphäroplasten hergestellt. Hierbei handelt es sich um Hefezellen, deren überwiegend aus Glukan- und Mannanschichten bestehende Zellwand durch die im Verdauungssaft der Weinbergschnecke enthaltenen Enzyme abgebaut wurde. Ohne die sie schützende Zellwand sind die Zellen osmotisch sehr labil und nur in einem isotonischen Puffer stabil.

Da bei Sphäroplasten kein periplasmatischer Raum mehr vorhanden ist, wäre zu erwarten, daß durch zweimaliges Waschen der Sphäroplasten mit Stabilisator sich ebenfalls Bindungsproteine lösen.

3.1.1 Material und Methoden

Präparation von Hefesphäroplasten

Hefezellen aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase wurden in einem Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA und 5 mM Dithioerythrit) mit einem Zelltitert von 10^8 /ml bei 30°C für 15 min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen. 10^{10} Zellen wurden in einem Gemisch aus

4 ml 1,2 M KCl

2 ml 20 mM Dithioerythrit

und 2 ml Schneckenenzym⁺⁺ bei 30°C so lange inkubiert (ca. 60 min), bis etwa 95% der Zellen als Sphäroplasten vorlagen. Die Sphäroplasten wurden vorsichtig in einer Christ-Laborzentrifuge für 4 min bei 1 000 Upm abzentrifugiert und 2 x mit Stabilisator (0,6 M Mannit und 0,25 M Glucose in 50 mM Citratpuffer, pH 5,5) gewaschen.

Messung der Purinaufnahme in Sphäroplasten

1 ml einer Sphäroplastensuspension (2×10^8 /ml) wurden in 9 ml eines Gemisches aus

200 μ l 100 μ M 14 C-Hypoxanthin (59 Ci/Mol)

1 ml 1 mM Hypoxanthin

und 7,8 ml Stabilisator gegeben.

Nach genau definierten Zeiten wurden 1 ml der Suspension entnommen und in 5 ml eiskalten Stabilisator pipettiert und sofort über Glasfaserfilter abgesaugt. Die Filter wurden getrocknet. Ihre Radioaktivität wurde in einem Toluol-Cocktail mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers bestimmt.

++

Suc d' Helix pomatia, Industrie Biologique Francaise,
Clichy, France

3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Um die Existenz eines lose mit der Membran assoziierten Purin-Bindungsproteins nachzuweisen, wurde die Hypoxanthinaufnahme exponentieller Zellen vor und nach 15 min Inkubation in destilliertem Wasser gemessen.

Verlieren die Zellen während der Inkubation Purin-Bindungsproteine, so müßte bei der sich anschließende Aufnahmemessung die initiale Aufnahmegeschwindigkeit geringer sein als vor der Inkubation.

Abb. 17 zeigt eine deutlich verringerte initiale Aufnahmegeschwindigkeit für Hypoxanthin nach 15 min Inkubation der Zellen in destilliertem Wasser.

Da die Zellen durch Überführen aus dem Kulturmedium in destilliertes Wasser einem osmotischen Schock ausgesetzt werden, läßt sich die Abnahme der initialen Aufnahmegeschwindigkeit auch durch den Verlust energiereicher Metaboliten oder durch eine Störung des K^+ - H^+ -Gradienten erklären.

Zur Klärung dieser Frage wurden aus exponentiellen Zellen Sphäroplasten hergestellt und nach unterschiedlicher Vorbehandlung Aufnahmeversuche durchgeführt.

Abb. 18 zeigt, daß sich Sphäroplasten in ihrer initialen Aufnahmegeschwindigkeit nicht von unbehandelten intakten Zellen unterscheiden. Auch 15 min Präinkubation der Sphäroplasten in Stabilisator-Lösung, die 50 mM $NaClO_4$ bzw. 50 mM EDTA enthält, führen zu keiner Verringerung der initialen Aufnahmegeschwindigkeit. Wie bereits erwähnt, lockert $NaClO_4$ das Membrangefüge und erhöht die Löslichkeit von Proteinen. EDTA komplexiert bivalente Kationen, über die viele periphere Proteine an die Plasmamembran gebunden sind [28, 29].

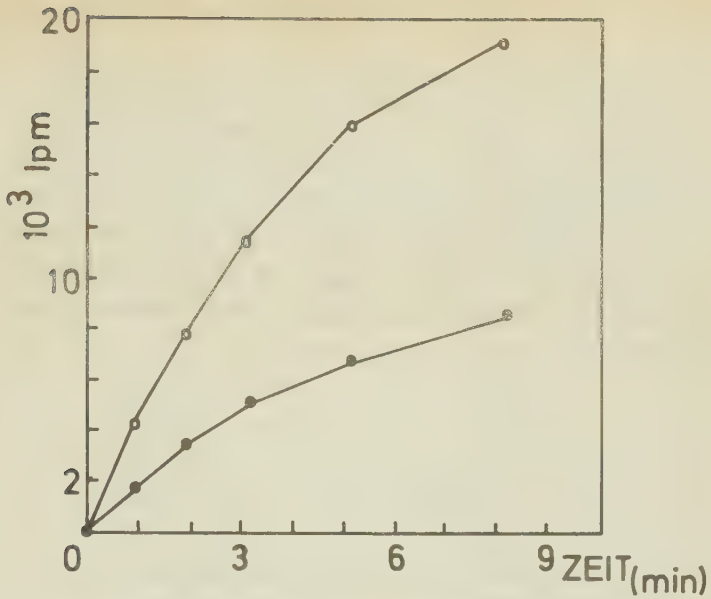


Abb. 17: Hypoxanthinaufnahme exponentieller Zellen vor (○—○) und nach 15 min Inkubation in destilliertem Wasser (●—●).

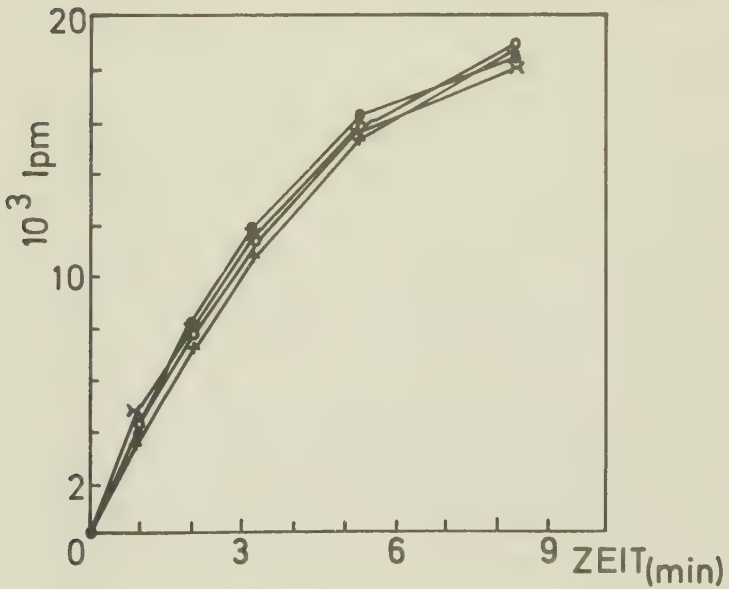


Abb. 18: Hypoxanthinaufnahme exponentieller Zellen (○—○) und Sphäroplasten ohne (●—●) und nach 15 min Inkubation in 50 mM NaClO_4 (+—+) bzw. 50 mM EDTA (x—x).

Diese Versuche zeigen, daß die Verringerung der initialen Aufnahmegeschwindigkeit durch Waschen intakter Hefezellen mit destilliertem Wasser höchstwahrscheinlich auf den durch diese Prozedur bedingten Verlust interner energiereicher Metaboliten oder Ionen zurückzuführen ist. An der Substratbindung dürfte somit kein lose mit der Plasmamembran assoziiertes Bindungsprotein beteiligt sein.

3.2 Versuche zur Isolierung integraler Membranproteine, die Purinbasen binden

Die vorausgegangenen Versuche zeigen, daß für die Substratbindung sehr wahrscheinlich ein integrales Membranprotein verantwortlich ist. Zu seiner Isolierung wurde folgende Strategie entwickelt:

- Durch einen ersten osmotischen Schock werden - zumindest partiell - die in der Zellwand verankerten muralen Proteine gelöst [30], so daß die Zellwand für größere Moleküle (z.B. Membranproteine) leichter passierbar wird.
- Anschließend werden die Zellen in einem hochmolaren Puffer der Wirkung des chaotropen Agens NaClO_4 ausgesetzt. Dies bewirkt eine Lockerung der Plasmamembranstruktur.
- Danach werden die Zellen durch Überführen in einen niedermolaren Puffer einem zweiten osmotischen Schock ausgesetzt. Hierdurch sollen aus der gelockerten Plasmamembran Proteine durch die Zellwand in die Schockflüssigkeit gespült werden.

Als Nachweismethode für ein isoliertes Purin-Bindungsprotein dient die Gleichgewichtsdialyse.

Das hierzu benutzte Gerät besteht aus zwei, durch eine semipermeable Membran getrennte Kammern. Sind beide Kammern nur mit Wasser gefüllt (Kontrollansatz) und löst man in einer Kammer eine Substanz, die in der Lage ist, die Membran zu passieren, so stellt sich nach einiger Zeit ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen beiden Kammern ein. Die Gleichgewichtseinstellung läßt sich durch die Entnahme von Aliquoten aus beiden Kammern leicht überprüfen, wenn die eingesetzte Substanz radioaktiv markiert ist. Befindet sich in einer der Kammern eine Substanz, die selbst nicht die Membran permeieren, jedoch die frei diffundierende Substanz bin-

den kann (z.B. ein Bindungsprotein), so stellt sich eine ungleiche Verteilung der Radioaktivität ein. Aus einer derartigen Ungleichverteilung können Rückschlüsse auf die Bindungseigenschaften des betreffenden Proteins gezogen werden.

3.2.1 Material und Methoden

Zellrohextrakte

Zellhomogenate wurden durch Mörsern von 2 g Feuchtheife mit Kieselgur nach der Methode von Reichert und Winter [5] hergestellt und auf ein Endvolumen von 2 ml gebracht.

Perchloratextraktion

Glucose-präinkubierte Zellen wurden nach dem in Abb. 19 wiedergegebenen Schema behandelt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Extrakte wurden in einem 7,5% Polyacrylamidgel nach der Methode von Davis [31] elektrophoretisch aufgetrennt. Bromphenolblau diente als Frontmarker. Die Proteinfärbung der Gele erfolgte nach Fairbanks et al. [32].

Induktion und Nachweis des extrazellulären Glykoproteins Invertase

Zur Induktion der Invertase wurden die Zellen statt in Glucose-Citratpuffer 3 h in Edinburgh-Minimal-Medium [33] inkubiert, in dem Glucose durch 2% (w/v) Saccharose ersetzt wurde. Die Zellen wurden anschließend der Perchloratextraktion unterzogen. Nach Auftrennung der Extrakte durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde wie folgt Invertase-Aktivität in den Gelen lokalisiert: Die Gele wurden in 32 Scheiben à 2 mm zerschnitten, jede Scheibe wurde bei 30°C in 1 ml 90 mM Saccharose in 75 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,65, inkubiert. Nach 30 min wurden jeweils 0,5 ml

Abb. 19

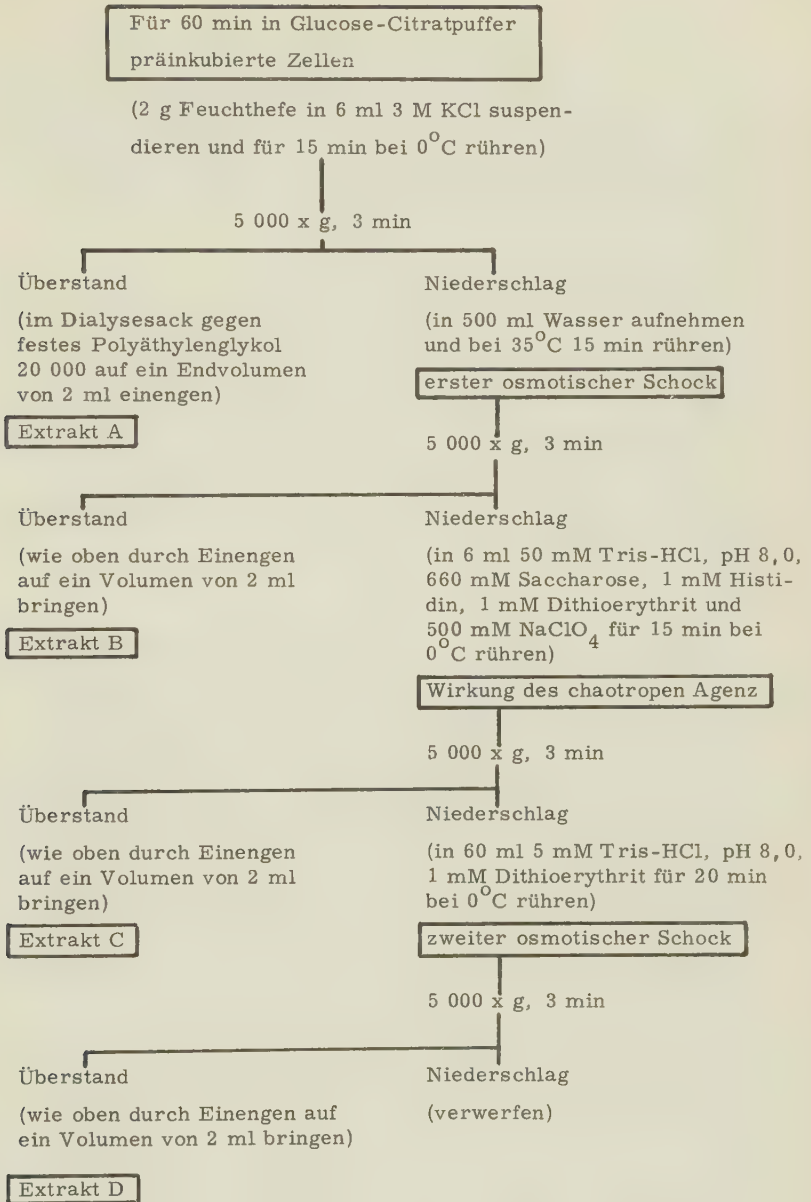


Abb. 19: Schema der Perchloratextraktion

entnommen und mit 0,5 ml einer Lösung bestehend aus 100 mg 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid in 100 ml 1 N NaOH gemischt [34]. Die Extinktion des sich bildenden roten Farbstoffs wurde nach 30 min bei 515 nm im Spektralphotometer gemessen. Sie galt als ein Maß für die Enzymaktivität.

Enzymaktivitätsbestimmungen

Die Aktivität glykolytischer Enzyme und die der Adenin- und Guanin-Desaminase in den verschiedenen Extrakten wurde nach den in Bergmeyer et al. [35] angegebenen Standardmethoden gemessen. Die Aktivitätsbestimmung der Purin-Phosphoribosyltransferasen erfolgte nach dem Verfahren von Schmidt et al. [36]. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der Biuret-Methode, mit Rinderalbumin als Standard, bestimmt.

Gleichgewichtsdialysen

Gleichgewichtsdialysen wurden in Mikro-Dialysekammern (2 x 200 μ l) durchgeführt. Die eine Kammerhälfte enthielt 150 μ l Extrakt (im Kontrollansatz 150 μ l Wasser, die andere Kammerhälfte 150 μ l 10 μ M 14 C-markiertes Substrat (ca. 50 Ci/Mol). Zur Beschleunigung der Gleichgewichtseinstellung wurden die Dialysezellen auf einer rotierenden Scheibe befestigt. Nach ca. 90 min wurden 50 μ l aus beiden Kammern entnommen und zur Radioaktivitätsmessung mit 1 ml Dioxan-Cocktail (5 g PPO, 100 g Naphthalin pro Liter Dioxan) versetzt.

3.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Ein Beweis für die postulierte Wirkungsweise der Perchloratextraktion könnte die Verteilung des Enzyms Invertase (EC 3. 2. 1. 26) in den Extrakten A und D sein (siehe Material und Methoden). Dieses Enzym tritt in Hefezellen in zwei Formen in Erscheinung [37]:

- a) als murales Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 270 000 und
- b) als cytoplasmatisches Enzym ohne Kohlehydratanteil mit einem Molekulargewicht von 135 000.

Beide Formen spalten Saccharose in die Monosaccharide Glucose und Fructose.

Während die cytoplasmatische Form des Enzyms konstitutiv , d.h. immer vorhanden ist, läßt sich die Synthese des Glykoproteins durch Inkubation der Hefezellen in einem Glucose-freien Medium, das mit Saccharose versetzt ist , induzieren.

Nach erfolgter Induktion der Invertase wurde mit den Zellen eine Perchloratextraktion durchgeführt. Die in Extrakt A und D enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch in einem 7,5% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend in 2 mm breite Scheiben geschnitten und die einzelnen Fraktionen auf ihre Invertaseaktivität hin untersucht.

Abb. 20 zeigt die Verteilung der "kleinen" und "großen" Invertase in Extrakt A und D. Das Verteilungsmuster bestätigt, daß durch den ersten osmotischen Schock nur das Glykoprotein Invertase aus der Zellwand gelöst wird. Erst während des zweiten osmotischen Schocks, nach der Wirkung des chaotropen Agens NaClO_4 , gelangt die cytoplasmatische Form der Invertase durch Plasmamembran und Zellwand in die Schockflüssigkeit.

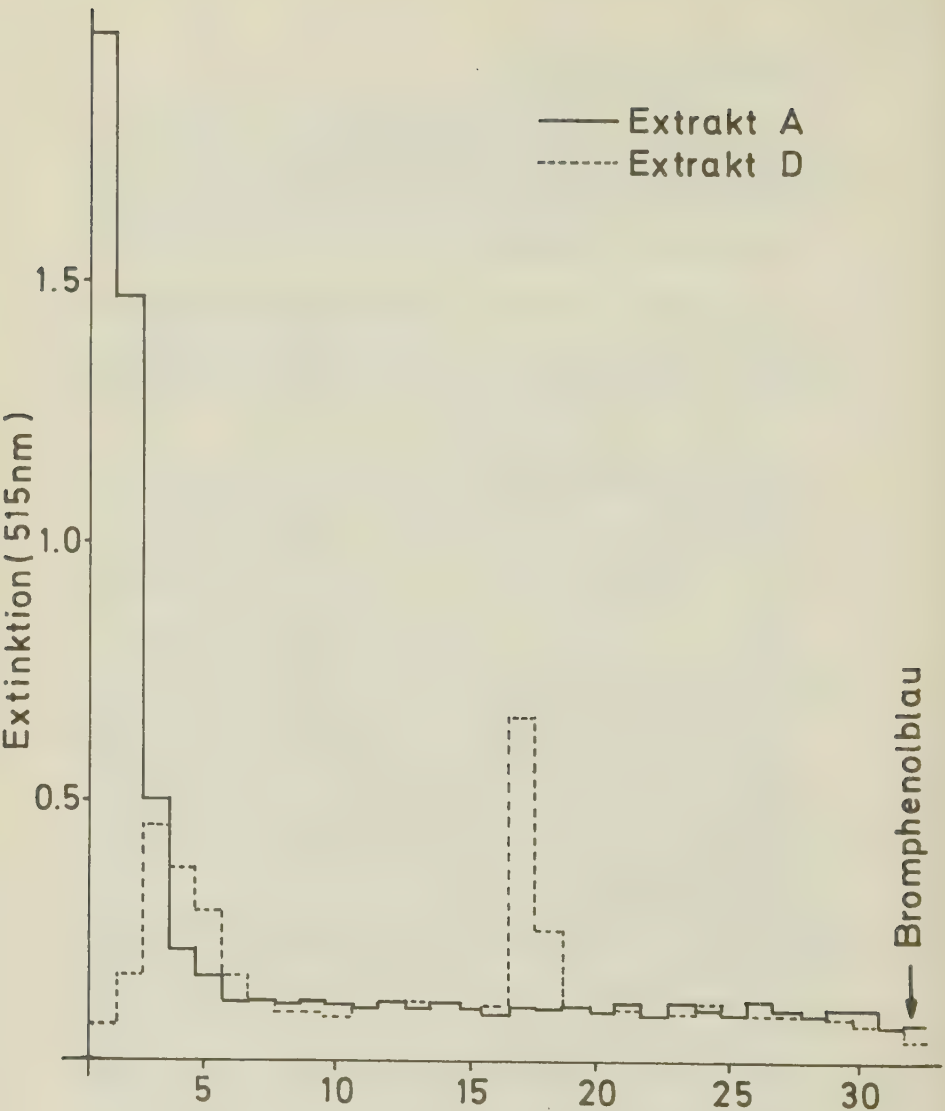


Abb. 20:

Verteilung der Invertaseaktivität in Extrakt A und D nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 7,5% Polyacrylamid-Gel. Das murale Glykoprotein befindet sich in den Fraktionen 1-5 und die cytoplasmatische Form der Invertase in den Fraktionen 17 und 18.

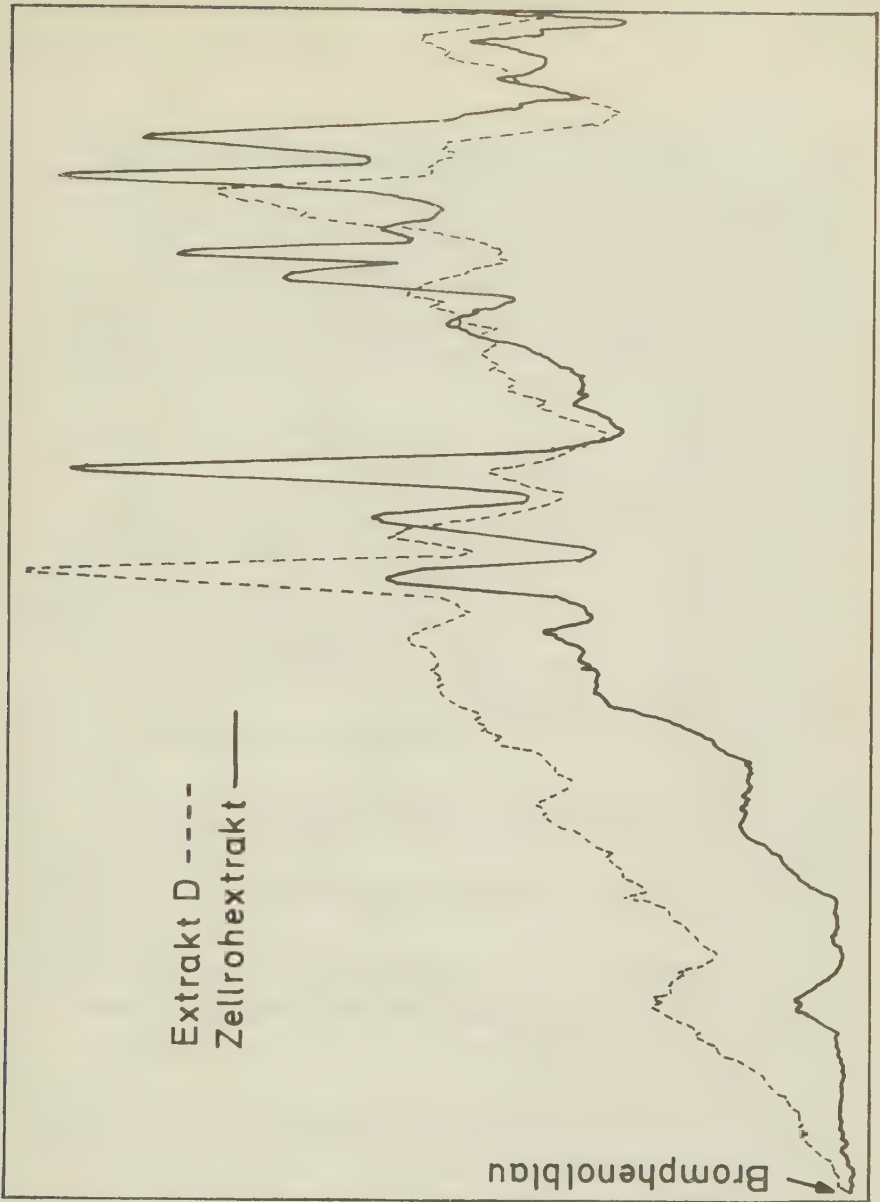


Abb. 21:

Proteinmuster in einem Zellrohextrakt und in Extrakt D nach elektrophoretischer Auftrennung gleicher Proteilmengen in einem 7,5% Polyacrylamid-Gel. Die Proteinfärbung wurde mit Coomassie-Blau vorgenommen. Die Gele wurden nach der Proteinfärbung bei 600 nm gescannt.

Um zu zeigen, daß es mit Hilfe der Perchloratextraktionsmethode gelingt Proteine selektiv zu isolieren, wurden gleiche Proteinmengen eines Zellrohextraktes und von Extrakt D in einem 7,5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Anfärben mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Die Gele wurden anschließend bei 600 nm gescannt. Vergleicht man in Abb. 21 das Proteinmuster des Zellrohextraktes, der die Gesamtheit der wasserlöslichen Proteine repräsentiert, mit dem des Extraktes D, so erkennt man, daß durch die Perchloratextraktion Proteine selektiv freigesetzt werden.

Um das Perchloratextraktionsverfahren weiter zu charakterisieren, wurden in einem Zellrohextrakt und in Extrakt D die Aktivität glykolytischer Enzyme bestimmt. Diese Enzyme sind besonders bei Hefen in ausreichender Aktivität vorhanden. Ihr Verteilungsmuster in beiden Extrakten läßt möglicherweise Rückschlüsse auf die Wirkungsweise der Extraktionsmethode zu.

Zusätzlich wurden Extraktionen mit unterschiedlichen NaClO_4 -Konzentrationen durchgeführt.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 3 und 4 wiedergegeben.

Sie zeigen,

- 1] daß bestimmte Enzyme bevorzugt extrahierbar sind (Tabelle 3, Nr. 1-3),
- 2] daß einige Enzyme nicht extrahierbar sind (Tabelle 3, Nr. 9-11),
- 3] daß die weitere Lebensfähigkeit der Zellen nach der Extraktion erst durch NaClO_4 -Konzentrationen über 1 M beeinträchtigt wird (Tabelle 4) und
- 4] daß einige Enzyme durch NaClO_4 bei Konzentrationen über 1 M inaktiviert werden (Tabelle 4).

Möglicherweise sind die gut extrahierbaren Enzyme an die Innenseite der Plasmamembran assoziiert und können so, da sie alle aus relativ kleinen Untereinheiten bestehen [Enolase 2 x 44 000, Hexokinase 2 x 51 000, Glucosephosphat-Isomerase 4 x 30 000 (38)],

die nach der Einwirkung von NaClO_4 gelockerte Plasmamembran gut passieren.

Für die Phosphoglyceratkinase mit einem Molekulargewicht von 34 000 wäre eine höhere Aktivität in Extrakt D zu erwarten gewesen, da sie, wie der Zellrohextrakt zeigt, reichlich in den Zellen vorhanden ist. Das Enzym wird wahrscheinlich durch NaClO_4 inaktiviert (Tabelle 4), so daß in Extrakt D nur noch eine Restaktivität meßbar ist.

Daß andererseits die fehlende Aktivität einiger Enzyme (Tabelle 3, Nr. 9-11) nicht auf ihre Inaktivierung durch NaClO_4 zurückzuführen ist, konnte durch 15 min Inkubation des Rohextraktes in 0.5 M NaClO_4 und anschließender Enzymaktivitätsbestimmung sichergestellt werden. Die betreffenden Enzyme wiesen nach dieser Behandlung keinen Aktivitätsverlust auf.

Als Maß für das Überleben der Zellen nach der Perchloratextraktion galt ihre Fähigkeit, nach dem Ausplatten auf Vollmedium Kolonien zu bilden.

Zum Nachweis der Anwesenheit von Purinbindenden Proteinen wurden mit Extrakt A - D Gleichgewichtsdialysen gegen ^{14}C -markiertes Adenin, Guanin und Hypoxanthin durchgeführt. Je nach Präparation und Base konnten nur in Extrakt D zwischen 10 und 15 % Bindung gemessen werden (Tabelle 5).

Enzyme)	Mol. Gew.	Spez. Aktivität ⁺ Extrakt D	Spez. Aktivität ⁺ Zellrohextrakt
1 Enolase (EC 4.2.1.11)	88,000 a	16,2	8,3
2 Hexokinase (EC 2.7.1.1)	102,000 a	7,7	3,7
3 Glucosephosphat- isomerase (EC 5.3.1.9)	119,400 a	6,7	2,1
4 Phosphoglycerat- kinase (EC 2.7.2.3)	34,000 b	1,9	11,5
5 6-Phosphofructo- kinase (EC 2.7.1.11)	590,000 a	1,2	1,5
6 Glyceraldehydphos- phat-dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	140,000 a	1,2	6,7
7 Phosphoglycero- mutase (EC 2.7.5.3)	110,000 a	0,8	19,2
8 Alkoholdehydroge- nase (EC 1.1.1.1)	141,000 a	0,8	1,6
9 Pyruvatdecarbo- xylase (EC 4.1.1.1)	209,000 a	0	1,6
10 Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)	161,000 a	0	0,4
11 Glucose-6-phosphat- dehydrogenase (EC 1.1.1.49)	102,000 - 123,000 b	0	1,1

Tabelle 3: Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten in Extrakt D und einem Zellrohextrakt. a. Molekulargewicht nach l. c. [38]
b. " " " " l. c. [35].

+ Units/mg Protein

M NaClO ₄	Überlebende Zellen (%)	Protein (mg/ml)	Enzymaktivität in Extrakt D (Units/ml Extrakt)					
			Enolase	Hexokinase	Glucosephosphat- isomerase	Phosphoglycerat- kinase	6-Phosphofructo- kinase	Glyceraldehyd- phosphat-dehydro- genase
0,01	98	0,7	3,1	2,7	2,2	0,1	0,1	0,1
0,05	97	0,9	4,4	4,0	4,2	0,3	0,3	0,2
0,1	96	1,0	11,6	7,2	5,8	1,1	0,8	0,6
0,5	96	1,2	19,5	9,3	8,0	2,3	1,5	1,4
1,0	90	1,8	27,3	12,6	11,1	3,3	2,4	1,9
2,0	60	2,8	19,2	14,4	12,6	2,1	1,8	1,7
3,0	43	4,1	19,4	14,0	13,5	1,4	0,9	0,1

Tabelle 4:

Der Einfluß unterschiedlicher NaClO₄-Konzentrationen auf das Überleben der Zellen, die Freisetzung von Protein und die Enzymaktivitäten in Extrakt D.

Wenn es sich bei der festgestellten Bindung um eine spezifische Wechselwirkung des Substrates mit einer Komponente des Purin-transportsystems handelt, so sollte diese Bindung durch Zugabe nichtmarkierter Basen kompetitiv hemmbar sein.

Die Versuchsergebnisse (Tabelle 5) zeigen:

- 1) daß die Bindung von ^{14}C -Adenin durch keine andere Basen wesentlich gehemmt wird und
- 2) daß die Bindung von ^{14}C -Guanin und ^{14}C -Hypoxanthin durch Hypoxanthin bzw. Guanin gehemmt wird, nicht aber durch Adenin.

Substrat	ohne Inhibitor	% Bindung in Gegenwart von 50 μM nicht- markiertem		
		Adenin	Guanin	Hypoxanthin
5 μM ^{14}C -Adenin	5, 4	---	4, 4	4, 9
5 μM ^{14}C -Guanin	15, 5	15, 1	---	4, 3
5 μM ^{14}C -Hypoxanthin	16, 8	15, 6	4, 5	---

Tabelle 5

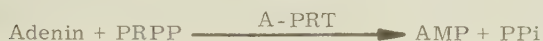
% Bindung im Extrakt D nach Gleichgewichtsdialyse

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß zumindest der Hauptanteil der Bindung nicht auf einer spezifischen Wechselwirkung mit isolierten Purin-Bindungsproteinen, sondern vielmehr mit intrazellulären Enzymen des Purinstoffwechsels beruht.

Hierfür kommen nur Enzyme in Frage, die die reine Form der Basen als Substrat erkennen. Dies sind neben den beiden Phosphoribosyltransferasen Adenin-Phosphoribosyltransferase A-PRT

(EC 2.4.2.7) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase HG-PRT (EC 2.4.2.8) die Adenin- und Guanin-Desaminase (EC 3.5.4.2 bzw. 3.5.4.3).

Von den genannten Enzymen konnten nur die beiden Phosphoribosyltransferasen in Extrakt D nachgewiesen werden. Diese Enzyme katalysieren unter Verbrauch von 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) folgende Reaktionen:



Das Vorhandensein der A-PRT und HG-PRT in Extrakt D erklärt das Ergebnis der kompetitiven Hemmversuche der Gleichgewichtsdialyse. Adenin wird nur von der A-PRT als Substrat erkannt, die gemessene Bindung ist durch keine andere Base hemmbar. Die HG-PRT bindet Hypoxanthin und Guanin und nur Guanin bzw. Hypoxanthin hemmen kompetitiv, nicht aber Adenin. Diese Versuche zeigen, daß es mit Hilfe der Perchloratextraktion nicht gelingt, nachweisbare Mengen eines Purin-Bindungsproteins zu isolieren.

3.3 Messung von Substratbindung und Substrataufnahme durch Plasmamembranvesikel

Zur Erklärung des negativen Ergebnisses der Extraktionsversuche gibt es mehrere Möglichkeiten:

- 1] das Bindungsprotein wird nicht gelöst,
- 2] es tritt eine Inaktivierung des Purin-Bindungsproteins ein, wenn es aus der Plasmamembran gelöst wird und
- 3] in der Membran befinden sich so wenig Bindungsproteine, daß ihr Nachweis mit Hilfe der angewandten Methode nicht möglich ist.

In den folgenden Experimenten wird versucht, mit Hilfe von Plasmamembranvesikeln zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden.

3.3.1 Material und Methoden

Präparation von Plasmamembranvesikeln

In GYNP-Medium gezüchtete Hefezellen des Stammes R XII wurden in der frühen exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für 2 h in Glucose-Citratpuffer, pH 5,4, inkubiert. Zur Präparation der Plasmamembranvesikel wurden die Hefezellen nach der Methode von Fuhrmann et al. [39] aufgearbeitet.

20 g Feuchthefer wurden in 20 ml eiskaltem Stabilisator (400 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ in 20 mM Triäthanolamin, pH 5,3) aufgenommen und mit 50 g Glaskugeln (0,25 - 0,30 mm) in einem Braun Homogenisator MSK für 45 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde 2 x 5 min bei 2 000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen, der Überstand über Glasfaserfilter (Sartorius Membranfilter 13 400) abgesaugt und anschließend 10 min bei 5 000 x g zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in Stabilisatorlösung aufgenommen und 3 x damit gewaschen (5 000 x g, 10 min). Zur Trennung der Plasmamembranvesikel von den Mitochondrienvesikeln wurde die Vesikelsuspension mit osmotischem Stabilisator, der mit 1 M HCl auf pH 1,2 eingestellt wurde, auf pH 4.0 titriert. Nach 20 min bilden die aggregierten Mitochondrienvesikel einen Niederschlag. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und 3 min bei 38 000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in Stabilisator aufgenommen und abschließend 3 x durch einen Glasfaserfilter filtriert. Das Aufarbeitungsschema ist in Abb. 22 übersichtlich dargestellt.

Messung der Hypoxanthinaufnahme durch Plasmamembranvesikel

Plasmamembranvesikel mit einem internen pH von 6,8 und einer K^+ -Konzentration von 0.4 M wurden in 50 mM Natrium-acetatpuffer, pH 4,0, in Gegenwart von ^{14}C -Hypoxanthin inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden Vesikel über 0.45 μ Cellulosenitratfilter, über die ein Glasfaserfilter gelegt wurde, abgesaugt. Die Filter wurden anschließend getrocknet. Ihre Radioaktivität wurde in einem Toluol-Cocktail mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers bestimmt.

Hefezellsuspension in osmotischem Stabilisator
mit Braun Zellhomogenisator aufschließen

2 000 x g, 5 min, 2 x

Niederschlag verwerfen

gefilterter Überstand

5 000 x g, 10 min

Überstand verwerfen

Niederschlag in osmotischem
Stabilisator aufnehmen

5 000 x g, 10 min, 3 x

Überstand verwerfen

Niederschlag enthält
ca. 50% Mitochondrien-
und 50 % Plasmamembran-
vesikel

Aggregation der Mitochondrien-
vesikel bei pH 4.0

Aggregiertes Sediment (Mitochondrien)
verwerfen

38 000 x g, 3min

Niederschlag (Mitochondrien) verwerfen

Zweifache Filtration der
Plasmamembranvesikel

Plasmamembranvesikel 3 x
in osmotischem Stabilisator
ohne $MgCl_2$ waschen.

Abb. 22: Schema der Vesikelpräparation nach Fuhrmann et al. [39]

3.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Wird während der Präparation der Membranvesikel die Funktionsfähigkeit des in die Plasmamembran integrierten Purintransportsystems nicht beeinträchtigt, sollte es möglich sein, unter geeigneten Bedingungen die Akkumulation von Purinbasen zu messen.

Hierbei sind die im ersten Teil der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu berücksichtigen, die die Akkumulation der Purinbasen durch Kopplung eines H^+ - K^+ -Gradienten an das Purintransportsystem erklären.

Mit der auf S. 58 beschriebenen Versuchsanordnung konnte wiederholt eine Aufnahme von Hypoxanthin gemessen werden (Abb. 23).

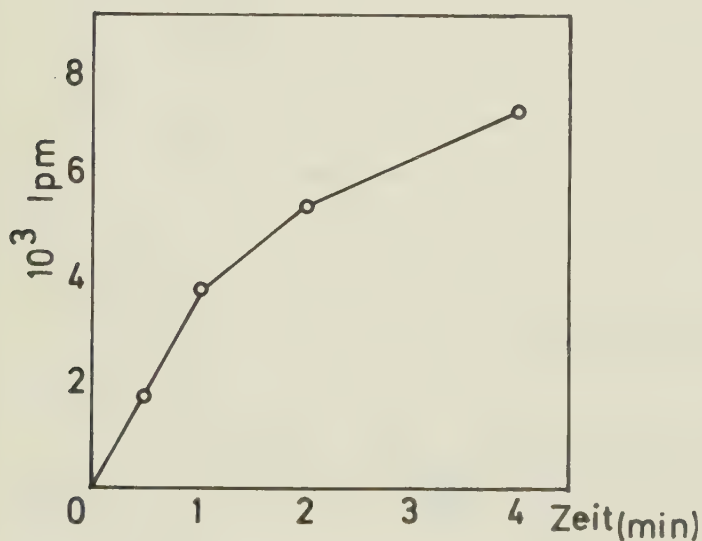


Abb. 23:

Hypoxanthinaufnahme durch Plasmamembranvesikel.

Wurden jedoch mit Plasmamembranen der gleichen Präparation Gleichgewichtsdialysen durchgeführt, konnte keine Bindung festgestellt werden.

Die Diskrepanz, daß die isolierten Membranvesikel ohne nachweisbare Bindung Purinbasen aufnehmen können, deutet darauf hin, daß die Zahl der pro Zelle vorhandenen Purintransportproteine sehr gering ist, so daß, selbst wenn es gelingt einen bestimmten Prozentsatz zu isolieren, es nicht möglich ist, ihre Existenz durch Bindung von ^{14}C -markierten Basen nachzuweisen.

Während der Durchführung dieser Versuche veröffentlichten Parlebas und Chevallier [40] eine Arbeit, die diese Vermutung bestätigt. Die Autoren konnten zeigen, daß die Zahl der Purintransportproteine bei *Saccharomyces* pro haploide Zelle nur $1,5 \times 10^4$ beträgt.

Basierend auf dieser Angabe errechnet sich wie folgt die maximale mögliche Bindung in der Gleichgewichtsdialyse:

Der Stamm R XII ist nach Aussagen von Kotyk ein Diplond, d. h.

$$\text{maximal} \quad 3 \times 10^4 \text{ Bindungsproteine/Zelle.}$$

Die Extraktion wird mit

$$1,3 \times 10^{10} \text{ Zellen durchgeführt und der}$$

Extrakt auf 2 ml eingengt.

Bei einer 100%igen Ausbeute wären dies:

$$3 \times 10^4 \times 1,3 \times 10^{10} \text{ Bindungsproteine/2 ml}$$

Hiervon werden 150 μl in die Gleichgewichtsdialyse eingesetzt.

Dies ergibt:

$$\frac{0,15 \times 3 \times 1,3 \times 10^{14}}{2} \text{ Bindungsproteine/Dialyse-ansatz}$$

Das sind:

$$\frac{0,15 \times 3 \times 1,3 \times 10^{14}}{2 \times 6,023 \times 10^{23}} \text{ Mol Bindungsproteine/Dialyse-ansatz}$$

Der Gesamtdialyseansatz besteht aus 300 μ l 5 μ M 14 C-Purinbase (ca. 50 Ci/Mol).

Das sind: $0,3 \times 5 \times 10^{-9}$ Mol 14 C-Purinbase/300 μ l

Vorausgesetzt, das Bindungsprotein ist im Gleichgewicht 100%ig mit Substrat besetzt, ergibt sich folgende Berechnung:

Es gibt ca. 5×10^{-11} Mol Bindungsprotein/Dialyse
und $1,5 \times 10^{-9}$ Mol Substrat/Dialyse.

Die Konzentration des gebundenen Substrates beträgt:
 5×10^{-11} Mol/150 μ l.

Bei einer Zählausbeute von 90% ergibt dies:
 $5 \times 10^{-11} \times 50 \times 2 \times 10^{12}$ Ipm.

Das sind: 5 000 Ipm gebunden/150 μ l
oder 1,700 Ipm gebunden/50 μ l.

Die Konzentration des freien Substrates beträgt:
 $0,7 \times 10^{-9}$ Mol/150 μ l
dies sind: 25 000 Ipm frei/50 μ l.

Unter maximalen Voraussetzungen wären dies 7% Bindung. Bereits dieser Wert liegt am Rande des Auflösungsvermögens der angewandten Methode.

Um in Zukunft nachweisbare Mengen eines Purinbindungsproteins zu erhalten, bieten sich zwei Möglichkeiten an:

- 1) die Isolierung von Purintransportmutanten mit einer wesentlich höheren Zahl an Transportproteinen pro Zelle und
- 2) die Anreicherung isolierter Transportproteine mit Hilfe der Affinitätschromatographie.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit wurden bei unterschiedlichen Aufnahmebedingungen (pH, Ionenzusammensetzung) die kinetischen Parameter der Hypoxanthinaufnahme bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, daß das Purintransportsystem durch monovalente Kationen kompetitiv gehemmt wird und daß an der Substratbindung Protonen beteiligt sind.

Weitere Versuche mit strukturähnlichen organischen Verbindungen zeigten, daß diese die Hypoxanthinaufnahme nur dann kompetitiv hemmten, wenn sie in der kationischen Form vorlagen. Diese Ergebnisse und die Tatsache, daß sich der K_m -Wert einer Base mit steigendem pK-Wert, d. h. leichter Protonierbarkeit, verringert, ließen vermuten, daß nur die protonierte, kationische Form der Base als Substrat erkannt und gebunden wird.

Möglicherweise ist an der Substratbindung eine negativ geladene Aminosäureseitenkette des Transportproteins beteiligt.

Durch Auftragung der ermittelten kinetischen Parameter V_{max} und K_m im Dixon-Diagramm konnten die pK-Werte der an der Substratbindung beteiligten Gruppen ermittelt werden. Es ergaben sich zwei pK-Werte, ein pK von 1,8, der dem pK-Wert von Hypoxanthin entspricht und ein pK-Wert von 5,2, der möglicherweise einer COO^- -Gruppe des Transportproteins zuzuordnen ist.

Diese Vermutung konnte durch den Einsatz eines Carbodiimids als spezifischer Hemmstoff für Carboxylgruppen untermauert werden.

Anhand dieser Versuchsergebnisse wurden Modelle für den molekularen Mechanismus der Substratbindung und Energiekopplung an das Purintransportsystem erstellt. Sie sehen vor, daß die protonierte, geladene Form des Substrates von der deprotonierten Form des Transportproteins gebunden wird. Die Akkumulation der Basen wird durch Kopplung eines vorhandenen K^+ - H^+ -Gradienten an das Transportsystem erklärt. Entsprechend der Terminologie von

Mitchell fungiert das Purintransportsystem als Protonen-Symporter und Kalium-Antiporter.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte durch Aufnahmeversuche mit Sphäroplasten gezeigt werden, daß die Substratbindung an das Purintransportsystem nicht wie bei manchen anderen Systemen über ein peripher, lose mit der Plasmamembran assoziiertes Bindungsprotein erfolgt.

Durch kombinierten Einsatz von osmotischem Schock und der Wirkung des chaotropen Agens NaClO_4 wurde versucht, aus intakten Hefezellen ein integrales Purinbindungsprotein zu isolieren. Die nähere Charakterisierung der Wirkungsweise der Extraktionsmethode zeigte, daß es mit ihr gelingt, sukzessive murale, cytoplasmatische und wahrscheinlich auch integrale Membranproteine zu lösen.

In einer Fraktion (Extrakt D) konnte auch Purinbindungsaktivität festgestellt werden.

Weitere Versuche zeigten jedoch, daß die gemessene Bindung zum überwiegenden Teil auf einer Wechselwirkung mit den beiden im Extrakt nachgewiesenen Purin-Phosphoribosyltransferasen beruhte.

Mit isolierten Plasmamembranvesikeln wurden Aufnahme- und Bindungsstudien durchgeführt. Während die Membranvesikel Purinbasen aufnahmen, konnte mit den gleichen Präparationen keine Bindung gemessen werden.

Aus diesem Befund wurde geschlossen, daß die Zellen zu wenig Bindungsproteine enthalten, um sie mit der angewandten Methode (Gleichgewichtsdialyse) nachweisen zu können.

5. LITERATUR

- 1] Collander, R. [1937] Trans. Faraday Soc. 33, 985-990
- 2] Pardee, A.B. [1968] Science 162, 632-637
- 3] Rickenberg, H.V., Cohen, G.N., Buttin, G. und Monod, J.
[1956] Ann. Inst. Pasteur 91, 829-857
- 4] Fox, C.F. und Kennedy, E.P. [1965] Proc. Nat. Acad. Sci.
US. 54, 891-899
- 5] Reichert, U. und Winter, M. [1974] Biochim. Biophys. Acta 356,
108-116
- 6] Polak, A. und Grenson, M. [1973] Eur. J. Biochem. 32, 276-282
- 7] Berlin, R.D. und Stadtman, E.R. [1966] J. Biol. Chem. 241,
2679-2686
- 8] Hochstadt-Ozer, J. und Stadtman, E.R. [1971] J. Biol. Chem. 246,
5304-5311
- 9] Hochstadt-Ozer, J. und Stadtman, E.R. [1971] J. Biol. Chem. 246,
5312-5320
- 10] Hübener, M. [1974] Diplomarbeit, Freie Universität Berlin
- 11] Pickering, W.R. und Woods, R.A. [1972] Biochem. Biophys.
Acta 264, 45-58
- 12] McIlvain, T.C. [1921] J. Biol. Chem. 49, 183-186
- 13] Dixon, M. und Webb, E.C. [1971] Enzymes, 2nd Edition,
Longman Group Ltd., London, pp. 328-330
- 14] Caaraway, K.L. und Koshland, D.E. [1972] Meth. Enzymol. 25B,
616-623
- 15] Fields, R. [1972] Meth. Enzymol. 25 B, 464-468
- 16] Rothstein, A. und Bruce, M. [1958] J. Cell. comp. Physiol. 51,
145-159
- 17] Mitchell, P. [1967] Comprehensive Biochemistry 22, Elsevier
Publishing Comp. Ltd., pp. 167-197
- 18] Kotyk, A. und Janáček, K. [1975] Cell membrane transport,
Plenum Press, New York und London,
pp. 195-209
- 19] Fox, F.C. und Keith, A.D. [1972] Membrane molecular biology,
Sinauer Ass. Inc. Stanford, Conn., pp. 289-323

- 20] Opekarová, M., Kotyk, A., Horák, J. und Kholodenko, V. P. [1975] *Eur. J. Biochem.* 59, 373-376
- 21] Helenius, A. und Kai, S. [1975] *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-75
- 22] Gulik-Krzywicki, T. [1975] *Biochim. Biophys. Acta* 415, 1-28
- 23] Horák, J. und Kotyk, A. [1973] *Eur. J. Biochem.* 32, 36-41
- 24] Hatefi, Y. und Hanstein W. G. [1974] *Methods Enzymol.* 31, 770-790
- 25] Hatefi, Y. und Hanstein W. G. [1969] *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 62, 1129-1136
- 26] Long, F. A. und McDavit, W. F. [1952] *Chem. Rev.* 51, 119-123
- 27] Jones, T. H. D. und Kennedy, E. P. [1968] *Fed. Proc.* 27, 644-651
- 28] Guidotti, G. [1972] *Ann. Rev. Biochem.* 41, 731-752
- 29] Razin, S. [1972] *Biochim. Biophys. Acta* 265, 241-296
- 30] Schwencke, J., Farias, G. und Rojas, M. [1971] *Eur. J. Biochem.* 21, 137-143
- 31] Davis, B. J. [1964] *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427
- 32] Fairbanks, G. L., Steck, L. und Wallach, D. F. H. [1971] *Biochemistry* 10, 2606-2617
- 33] Nitchison, J. M. und Gross, P. R. [1965] *Exp. Cell. Res.* 37, 259-277
- 34] Gabriel, O. und Wang, S. F. [1968] *Annal. Biochem.* 27, 545-554
- 35] Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. und Graßl, M. [1970] *Methoden der enzymatischen Analyse*, 2. Ausgabe, Band I, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. pp. 388-483
- 36] Schmidt, R., Forêt, M. und Reichert, U. [1976] *Clin. Chem.* 22, 67-69
- 37] Gascón, S., Neumann, N. P. und Lampen, O. [1968] *J. Biol. Chem.* 243, 1573-1577
- 38] Darnall, W. D. und Klotz, I. M. [1975] *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 652-682
- 39] Fuhrmann, G. F., Boehm, C. und Theuvenet, A. P. R. [1976] *Biochim. Biophys. Acta* 433, 582-597
- 40] Parlebas, N. und Chevallier, M. R. [1976] *FEBS Letters* 53, 327-334

LEBENS LAUF

3. 7. 1942	geboren in Bad Kreuznach
1948-1953	Besuch der Volksschule in Bad Kreuznach
1953-1961	Besuch des Gymnasiums "Heimschule Lender" in Sasbach/Achern, abgeschlossen mit der Primareife
1961-1967	Flugsicherungsbereichskontrolleiter bei der Bundesluftwaffe
1967-1968	Besuch der Abendschule "Gabbes Lehranstal- ten" in Berlin
11. 11. 1968	Hochschulreife
WS 1969/70	Immatrikulation an der Freien Universität Berlin, Studienrichtung Allgemeine Biologie und Genetik, FB 23
1. 11. 1971	Diplomvorprüfung
1971-1973	Anfertigung der Diplomarbeit am Zentralinsti- tut für Biochemie und Biophysik der FUB (ZI 5)
13. 4. 1973	Diplomhauptprüfung abgelegt
1. 5. 1973	Beginn der Doktorarbeit am ZI 5 unter Leitung von Priv.Doiz.Dr. Uwe Reichert
1. 9. 1976	Wissenschaftlicher Assistent an der FU Berlin, FB 23 [Biologie], Institut für Biophysik WE 01

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von
Priv.Do. Dr. Uwe Reichert durchgeführt.

Ich danke ihm für die Überlassung des Themas und
für die hilfreiche Diskussion während der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Fräulein Martine Forêt
für die ausgezeichnete technische Assistenz und
Herrn Heinz Posorski für die Anfertigung einer Reihe
technischer Geräte.

